

Entwicklung immunchemischer Schnelltestverfahren

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
Diplom-Chemiker Henning Stückmann
geboren am 24.05.1976 in Hannover

Hannover 2007

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Roland Ulber
Tag der Promotion: 15.01.2007

„Es gibt Leute, die nur aus dem Grunde in jeder Suppe ein Haar finden, weil sie, wenn sie davor sitzen, so lange den Kopf schütteln, bis eins hinein-fällt.“

Christian Friedrich Hebbel

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation

„Entwicklung immunchemischer Schnelltestverfahren“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 28.10.2006

Henning Stückmann

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen September 2002 und November 2006 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover (TCI) unter Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheper. Ohne die Mithilfe zahlreicher Personen wäre es nicht möglich gewesen, die Arbeit fertigzustellen. Besonders sei an dieser Stelle gedankt

- Prof. Dr. Thomas Scheper (TCI) für die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, sowie für seine Betreuung und Unterstützung und seine wertvollen Kontakte,
- Prof. Dr. Roland Ulber (Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern) für die Möglichkeit, das Microcystin-Projekt zu bearbeiten, sowie für seine Unterstützung und immer neue kreative Ideen und ebenso für die Übernahme des Co-Referats,
- Dr. Udo Noack (Dr.U.Noack-Laboratorien, Sarstedt) für die Zusammenarbeit und finanzielle Unterstützung beim Microcystin-Projekt,
- Gunda Winkelmann und dem Laborpersonal der Dr.U.Noack-Laboratorien, Sarstedt, für die Einblicke in die HPLC-Analytik von MC-LR und die Anzucht von Miesmuscheln und Blaualgen,
- Dr. Hans Beer und Dr. Karl Pflanz (Sartorius AG, Göttingen) für einen Einblick in ihr umfangreiches, langjähriges Fachwissen und die Ermöglichung eines Teils der praktischen Arbeiten,
- Stephen Kroll, Nils Tippkötter und Matthias Wawra (TCI) für ihre motivierte Mitarbeit an den gemeinsamen Projekten und für viele interessante Fachgespräche,
- David Geissler (TCI) für das Simplex-Programm, das mir viel Arbeit abgenommen hat,
- Anja Ulrich und Doris Hickmann (Sartorius) für viele Tipps im Laboralltag,
- Martina Weiß (TCI) für ihr stets offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft,
- Timo Klewitz (TCI) für die Einführung in das interessante Thema,
- den Kollegen am TCI und vor allem dem Team des Daddel-Office für das nette Arbeitsklima,
- Daniela Harkensee und Sascha Beutel (TCI) für das ausgiebige Korrekturlesen,
- meinen Eltern Monika und Roland Stückmann dafür, dass sie mir das Chemiestudium ermöglicht haben und mich während meiner Studien- und Promotionszeit sowohl ideell, als auch materiell unterstützt haben und mich immer wieder angetrieben haben,
- meiner Frau Jessica Stückmann für Ihre Geduld und Ihr Verständnis vor allem in den letzten Monaten.

Zusammenfassung

Nicht nur in der Humanmedizin sind schnelle, einfache und kostengünstige Analysenmethoden verschiedenster Proben von großem Interesse. Auch in anderen medizinischen, biologischen oder ökologischen Bereichen kann neben der Sensitivität eines Analysensystems vor allem die Geschwindigkeit der Analyse von entscheidender Bedeutung sein. Oft ist außerdem die Unabhängigkeit von großen Gerätschaften und Laboreinrichtungen wünschenswert.

Membran-basierte, preisgünstige immunchromatographische Schnelltests bieten auch dem ungeschulten Anwender innerhalb kürzester Zeit eine verlässliche Aussage darüber, ob in einer flüssigen Probe ein bestimmter Stoff in einer bestimmten Konzentration enthalten ist oder nicht. Neben Schwangerschaftshormonen können beispielsweise verschiedenste Markerproteine in menschlichen Proben ermittelt werden. So sind u.a. Tumorerkrankungen oder infektiöse Krankheiten schnell und zuverlässig zu detektieren. Auch Drogenkonsum lässt sich über immunchromatographische Methoden nachweisen. Neben diesen humandiagnostischen Anwendungen findet sich die Technik auch mehr und mehr in anderen Bereichen. So verwendet auch die Veterinärmedizin immunchromatographische Schnelltests und ebenso die Umwelt- und Lebensmittelanalytik.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung immunchromatographischer Testsysteme behandelt. Es wurden grundlegende Erkenntnisse über die Herstellung der einzelnen biochemischen Komponenten eines immunchromatographischen Schnelltests ermittelt, und ausgehend von einem simplen Modellsystem wurden zwei Schnelltests für das Enterotoxin B des bekannten Bakteriums *Staphylococcus aureus* (SEB) und das Algentoxin Microcystin-LR (MC-LR) des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* in verschiedenen Matrices entwickelt. Neben der Testentwicklung selbst wurden auch Methoden zur Testauswertung und Ergebniskontrolle etabliert.

Das entwickelte Schnelltestsystem für SEB liefert in einem Bereich von 25 ppb bis 10.000 bzw. 25.000 ppb SEB reproduzierbare Ergebnisse. Das Toxin konnte in allen Proben innerhalb dieses Bereiches einwandfrei nachgewiesen werden. Die Untersuchung realer Proben (Nahrungsmittel, Stuhl, Erdreich etc.) mit dem entwickelten Testsystem steht allerdings noch aus.

Die Entwicklung des MC-LR-Tests kann ebenfalls als erfolgreich bewertet werden. Am Ende der Arbeiten konnten zum einen ein Testsystem für Wasserproben (Nachweisgrenze bis 1 ppb bei vergleichenden Messungen bzw. 7,5 ppb bei absoluten Messungen) sowie ein optimiertes Schnelltestsystem für Proben mit hohen Feststoffgehalten vorgestellt werden,. Mit dem zweiten System konnte reproduzierbar eine optische Sichtbarkeitsgrenze von 90 ng MC-LR pro Gramm Muschel-Frischgewicht etabliert werden.

Durchaus erfolgreich gestaltete sich die Verwendung des Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Testkomponenten in beiden Testsystemen.

Stichworte: *Staphylococcus* Enterotoxin B, Microcystin-LR, Schnelltest.

Abstract

Fast, cost-saving and easy to use analytical methods for different samples are interesting not only in human medicine. Sensitivity and rapidness of the methods often are important in others medicinal, biological or ecological areas, too. Often the autonomy from stationary equipment and laboratory facilities is desirable as well.

Membrane based, cost-saving immunochromatographic rapid tests feature reliable results within shortest periods of time even to untrained users, if a liquid sample does contain a specific substance in a specific concentration or not. Beside pregnancy hormones for example different marker proteins in human samples can be detected. Cancer as well as infectious diseases are detectable quickly and reliably. Even drug abuse is traceable with immunochromatographic methods. Besides these applications for human diagnostics the technique is found in more and more other areas. Veterinary medicine uses immunochromatographic rapid tests as well as environmental and food analytics for example.

In this thesis the development of immunochromatographic test systems was discussed. Basic insights about the manufacturing of several biochemical components of immunochromatographic rapid tests were found, and starting from a simple model system two rapid tests for the enterotoxin B of staphylococcus aureus (SEB) and the algae toxin Microcystin-LR (MC-LR) of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in different matrices were developed. Beside the development of the tests methods for test analysis and result control were established.

The developed rapid test system for SEB provides reproducible results with 25 up to 10,000 and 25,000 ppb SEB respectively. It was possible to detect the toxin in all samples within these concentration limits. The examination of real samples (e.g. foods, stool, soil) with the developed test system are not accomplished yet.

The development of the MC-LR test was successful as well. At the end of the workings a test system for water samples (detection limit down to 1 ppb in comparing measurements and 7.5 ppb in absolute measurements) could be presented as

well as an optimized system for samples with a large solid content (as in mussels flesh). With this 2nd system a visible limit of 90 ng MC-LR per gram fresh mussels flesh could be established.

As well successful was the usage of the simplex algorithm for optimizing the test components in both systems.

Keywords: *Staphylococcus* Enterotoxin B, Microcystin-LR, rapid test.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	1
II. Theoretischer Teil	7
1. Einleitung.....	7
2. Überblick über Querfließschnelltests.....	9
2.1 Einordnung der Querfließschnelltests.....	9
2.2 Historische Entwicklung.....	10
2.3 Anwendungsgebiete.....	11
2.4 Marktbetrachtungen.....	13
2.5 Verschiedene Testformate.....	15
2.5.1 Allgemeine Betrachtungen.....	15
2.5.2 Sandwich-Format.....	16
2.5.3 Kompetitives Format.....	17
2.5.4 Vergleich der vorgestellten Testformate.....	18
2.6 Vor- und Nachteile von Querfließschnelltests.....	20
2.7 Funktionen der Einzelkomponenten.....	22
2.7.1 Cellulosenitrat-Membran.....	22
2.7.2 Conjugate Pad.....	23
2.7.3 Absorbent Pad.....	24
2.7.4 Sample Pad.....	24
2.7.5 Antikörper-Konjugate.....	25
3. Zielmoleküle.....	28
3.1 Auswahl der Zielmoleküle.....	28
3.1.1 Staphylococcus Enterotoxin B.....	28
3.1.2 Microcystin-LR.....	29
3.2 Details über Staphylococcus Enterotoxin B und Bedeutung für die Analytik.....	30
3.2.1 Herkunft und Struktur.....	30
3.2.2 Physiologische Eigenschaften.....	31
3.2.3 Analytische Details.....	33
3.3 Details über Microcystin-LR und Bedeutung für die Analytik.....	34

3.3.1 Herkunft und Struktur.....	34
3.3.2 Physiologische Eigenschaften.....	36
3.3.3 Analytische Details.....	36
III. Experimenteller Teil	39
1. Antikörper-Gold-Konjugate.....	39
1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten.....	39
1.1.1 Versuche mit einem Maus-anti-Maus-Testsystem.....	39
1.1.2 Versuche mit einem hCG-Testsystem.....	48
1.2 Optimierung der Konjugat-Qualität.....	53
1.2.1 Optimierung der Herstellungsdauer.....	53
1.2.2 Optimierung der Konjugationsbedingungen.....	53
1.2.3 Optimierung der Langzeitstabilität.....	55
1.3 Herstellung von Latex-Konjugaten.....	59
1.3.1 Passive Adsorption von Antikörpern an Latex-Partikel.....	59
1.4 Fazit.....	62
1.5 Ausblick.....	62
2. Teststreifen.....	63
2.1 Vorbehandlung der Einzelkomponenten.....	63
2.1.1 Membran.....	63
2.1.2 Conjugate Pad.....	64
2.1.3 Weitere Komponenten.....	65
2.2 Herstellung der Teststreifen.....	66
2.2.1 Zusammenkleben der Membran- und Pad-Materialien.....	66
2.2.2 Schneiden der Streifen.....	67
2.2.3 Auftragung des Konjugates.....	67
3. Durchführung von Schnelltests.....	69
4. Digitale Auswertung der Testergebnisse.....	70
4.1 Grundlagen der digitalen Bildauswertung.....	70
4.1.1 RGB-Farbraum.....	70
4.1.2 Farbtiefe und Auflösung.....	70
4.2 Entwicklung der „Lumibox“.....	71

4.3 Bildaufnahme.....	73
4.4 Bildauswertung mit Optimas 6.5.....	75
5. Statistische Versuchsplanung mit dem Simplex-Algorithmus.....	77
5.1 Allgemeine Bemerkungen zur statistischen Versuchsplanung.....	77
5.2 Der Simplex-Algorithmus.....	77
5.3 Anwendung des Simplex-Algorithmus bei der Entwicklung immunchemischer Schnelltests.....	79
6. Schnelltest für Staphylococcus Enterotoxin B.....	81
6.1 Vorversuche.....	82
6.1.1 Funktionsfähigkeit der immunchemischen Testkomponenten...	82
6.2 Versuche mit polyklonalen Antikörpern.....	84
6.2.1 Versuche mit Standardmaterialien für Schnelltestsysteme.....	84
6.2.2 Überprüfung der Fehlerquellen.....	86
6.2.3 Versuche mit anderen Membranmaterialien.....	89
6.2.4 Fazit.....	94
6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern.....	95
6.3.1 Erste Versuche mit fremdkonjugiertem Goldkonjugat.....	95
6.3.2 Vorversuche zu Modifikationen des Standardsystems.....	98
6.3.3 Einsatz des Simplex-Algorithmus zur Testmodifikation.....	103
6.3.4 Versuche mit selbst hergestelltem Antikörper-Gold-Konjugat.	107
6.4 Fazit und Ausblick.....	114
7. Schnelltest für Microcystin-LR.....	117
7.1 Vorüberlegungen.....	117
7.2 Entwicklung eines Standard-Testsystems.....	117
7.2.1 Herstellung des anti-MC-LR-Konjugates.....	117
7.2.2 Herstellung des Fängerreagenzes.....	118
7.2.3 Untersuchung der hergestellten Einzelkomponenten.....	120
7.3 Optimierung des Standard-Testsystems.....	125
7.3.1 Optimierung des Testsignals hinsichtlich der Erkennbarkeit...	126
7.3.2 Optimierung des Testsignals hinsichtlich der Testsensitivität.	128
7.3.3 Untersuchung der Ausgangsmaterialien und des Testsystems hinsichtlich der Langzeitstabilität.....	135

7.3.4 Fazit.....	138
7.4 Versuche mit Realproben und Anpassung des Testsystems.....	139
7.4.1 Anpassung des Testsystems auf Wasserproben.....	139
7.4.2 Anpassung des Testsystems auf Muschelproben.....	141
7.4.5 Zusammenführung der Ergebnisse aus den Anpassungen.....	148
7.5 Fazit.....	150
7.6 Ausblick.....	151
V. Fazit	153
VI. Literatur	157
VII. Anhang	165
1. Arbeitsanweisungen und Herstellungsanweisungen.....	165
1.1 Vorbereitende Arbeiten zur Herstellung der Teststreifen.....	165
1.1.1 Vorbereitung der Reaktionsgefäße.....	165
1.1.2 Imprägnierung der Conjugate Pads.....	165
1.1.3 Herstellung der Teststreifen.....	166
1.1.4 Applikation des Konjugates.....	166
1.2 Testsystem für Staphylococcus Enterotoxin B in wässrigen Proben.....	167
1.2.1 Herstellung des Konjugates.....	167
1.2.2 Herstellung der Teststreifen.....	168
1.3 Testsystem für Microcystin-LR in wässrigen Proben.....	168
1.3.1 Herstellung des Konjugates.....	168
1.3.2 Herstellung der Teststreifen.....	169
1.4 Testsystem für Microcystin-LR in Muschelfleisch.....	169
1.5 BCA-Test zur Bestimmung des MC-LR:BSA-Gehalts.....	169
2. Auswertungsroutinen für Optimas 6.5.....	170
2.1 Bildvorbereitung.....	170
2.2 Markierung der Testlinien.....	170
2.3 Auswertung der Teststreifen.....	170
3. Verwendete Lösungen.....	176
Adsorptionspuffer I zur Adsorption von Antikörpern auf Goldpartikeln..	176

I. Inhaltsverzeichnis

Adsorptionspuffer II zur Adsorption von Antikörpern auf Gold-Partikeln	176
Adsorptionspuffer III zur Adsorption von Antikörpern auf Latex-Partikeln.....	176
Applikationspuffer I für Proteinlinien.....	176
Applikationspuffer II für MC-LR:BSA.....	176
Boratpuffer zur Herstellung von MC-LR:BSA.....	177
Kaliumcarbonat-Lösung zur pH-Einstellung.....	177
Färbelösung für Proteine.....	177
Imprägnierungspuffer I für Conjugate Pads.....	177
Imprägnierungspuffer II für Conjugate Pads.....	177
KPP-Puffer I zur Herstellung von Verdünnungsreihen.....	178
KPP-Puffer II zum Waschen von Membranstanzlingen.....	178
KPP-Puffer III zur Lösung von Staphylococcus Enterotoxin B.....	178
KPP-Puffer IV zur Lösung von Staphylococcus Enterotoxin B.....	179
KPP-Puffer V zur Lösung von MC-LR.....	179
Lagerungspuffer I.....	179
Lagerungspuffer II.....	179
Lagerungspuffer III.....	180
PBS-Puffer zur Herstellung von MC-LR:BSA.....	180
Stammpuffer für hCG-Proben.....	180
Triethanolaminpuffer zur Herstellung von MC-LR:BSA.....	180
4. Verwendete Chemikalien.....	181
4.1 Antikörper.....	181
4.2 Membranen und Vliese.....	181
4.3 Toxine.....	182
4.4 Chemikalien.....	182
5. Verwendete Geräte.....	183
6. Verwendete Software.....	184
7. Abbildungsverzeichnis.....	185
8. Abkürzungen.....	187
Lebenslauf.....	189

II. Theoretischer Teil

1. Einleitung

Nicht nur in der humanmedizinischen Diagnostik sind schnelle, einfache und kostengünstige Analysen verschiedenster Proben von großem Interesse. Auch in anderen medizinischen, biologischen oder ökologischen Bereichen kann neben der Sensitivität eines Analysensystems vor allem die Geschwindigkeit der Analyse von entscheidender Bedeutung sein. Oft ist außerdem die Unabhängigkeit von großen Gerätschaften und Laboreinrichtungen wünschenswert.

Der rapide biotechnologische Fortschritt in den vergangenen Jahrzehnten hat die Möglichkeit eröffnet, Analysensysteme zu entwickeln, die die gerade genannten Erfordernisse vereinen. Membran-basierte immunchromatographische Schnelltests bieten auch dem ungeschulten Anwender innerhalb kürzester Zeit eine verlässliche Aussage darüber, ob in einer flüssigen Probe ein bestimmter Stoff in einer bestimmten Konzentration enthalten ist oder nicht. Die verwendeten Teststreifen sind nach wenigen Minuten per Augenschein auswertbar und kommen gänzlich ohne weiteren apparativen Aufwand aus. Darüber hinaus sind sie unter Berücksichtigung sämtlicher Kosten für den Einzelanwender sehr preisgünstig.

Was mit der Entwicklung von Tests zur Fruchtbarkeits- und Schwangerschaftsuntersuchung begann, hat sich inzwischen in verschiedensten Bereichen der Bioanalytik etabliert. Neben Schwangerschaftshormonen können beispielsweise verschiedenste Markerproteine in menschlichen Proben ermittelt werden. So sind u.a. Tumorerkrankungen oder infektiöse Krankheiten schnell und zuverlässig zu detektieren. Auch Drogenkonsum lässt sich über immunchromatographische Methoden nachweisen. Neben diesen humandiagnostischen Anwendungen findet sich die Technik auch mehr und mehr in anderen Bereichen. So greift auch die Veterinärmedizin auf immunchromatographische Schnelltests zurück, und ebenso ist eine Verwendung der Schnelltests im Bereich der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sehr gut möglich.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für Schnelltestsysteme trat nach den terroristischen Anschlägen vom 11. September 2001 in den USA in den Blickpunkt der Öffentlichkeit: die Bedrohung durch biologische und chemische Kampfstoffe. Offen wurde über die Bedrohung durch Anschläge mit toxischen biolo-

gischen Komponenten diskutiert und in der Folge auch darüber, wie solche biologischen Komponenten zeitnah und ortsungebunden erkannt werden können. Anschläge auf Privatpersonen in den USA, bei denen Proben des Milzbranderreger *Bacillus anthracis* per Post verschickt worden waren, zeigten, wie schnell in solchen Situationen verlässliche Informationen über die Gefährlichkeit einer unbekannten Substanz verfügbar sein sollten. Auch in diesem Bereich kommen inzwischen immunchromatographische Schnelltestsysteme zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung immunchromatographischer Testsysteme untersucht werden. Es sollen grundlegende Erkenntnisse über die Herstellung der einzelnen biochemischen Komponenten eines immunchromatographischen Schnelltests gewonnen werden und ein simples bekanntes immunchromatographisches Modellsystem aufgebaut werden. In einem weiteren Schritt sollen die so gewonnenen Ergebnisse auf die Entwicklung von Testsystemen für zwei sowohl wissenschaftlich als auch kommerziell interessante Zielmoleküle angewendet werden. Neben der Testentwicklung selbst ist auch die Etablierung von Methoden zur Testauswertung und Ergebniskontrolle ein Teil dieser Arbeit.

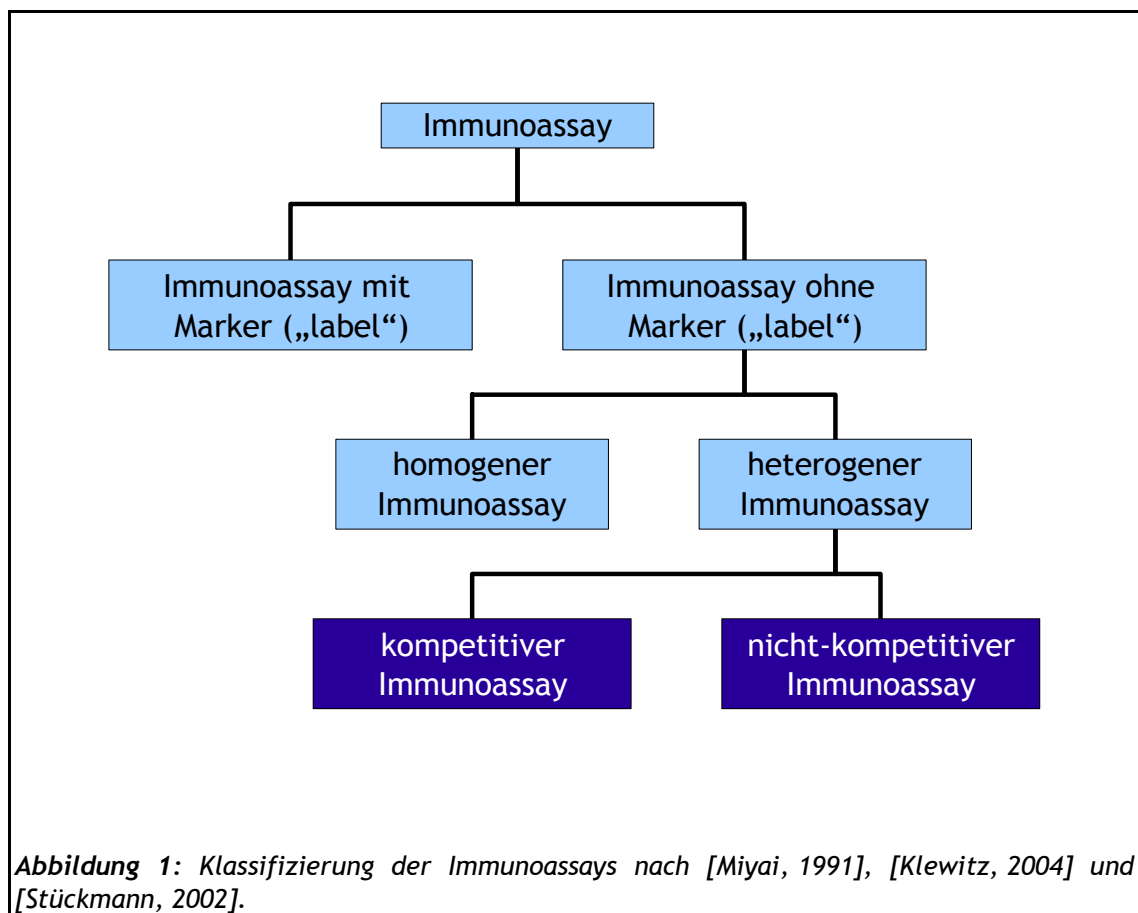
Als Zielmoleküle wurden zwei Vertreter aus Randbereichen der Schnelltest-Analytik ausgewählt, die dennoch aber nicht weniger interessant sind als beispielsweise humane Markerproteine: Während ein Test das Enterotoxin B des bekannten Bakteriums *Staphylococcus aureus* (SEB) nachweisen soll, soll ein zweiter Test das Algentoxin Microcystin-LR (MC-LR) des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* in verschiedenen Matrices detektieren.

2. Überblick über Querfließschnelltests

2.1 Einordnung der Querfließschnelltests

Als immunchemische Analysemethoden werden Verfahren bezeichnet, bei denen die sehr spezifischen Eigenschaften von Antikörpern zum Einsatz kommen. Diese können - je nach Format - sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper sein. Wegen ihrer besser zu definierenden Eigenschaften werden in der Analytik meistens monoklonale Antikörper (MAb) eingesetzt, deren Herstellung jedoch aufwändiger ist als die der polyklonalen Antikörper (PAb). Manche Testformate (z.B. Agglutinationstests) setzen allerdings auch gerade auf die Eigenschaften von PAb. Genauere Informationen über Antikörper sowie ihre Herstellung, Aufreinigung und Verwendung sind in der Literatur zu finden, u.a. bei [Zeck, 2001], [Berg, 2003], [Kroll, 2004].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, immunchemische Testverfahren zu klassifizieren. Eine ausführliche Übersicht dieser Gliederung ist bei [Miyai, 1991], [Klewitz, 2004] und [Stückmann, 2002] zu finden. Danach gehö-



ren die Querfließschnelltests (engl.: lateral-flow devices, LFD), die nach ihrem Nachweisreagenz auch als GLISA-Tests (Gold-Labeled Immunosorbent Assay), zu den gelabelten, heterogenen Immunoassays, da sie auf der Verwendung einerseits von markierten und andererseits von an einer festen Matrix immobilisierten Nachweisreagenzien basieren. Es sind sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive LFDs bekannt (Abb. 1). Beide Formate werden in der vorliegenden Arbeit vorgestellt und im Experimentellen Teil genauer untersucht.

2.2 Historische Entwicklung

Bereits seit den 1960er Jahren gelten immunchemische Testverfahren als zuverlässige Nachweise für sehr verschiedene, vor allem biologische Analyte. Neben der Entwicklung von Antikörpern und Testsystemen für immer neue Substanzen, stehen in der Forschung und Entwicklung zum einen die Optimierung bestehender Systeme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität und zum anderen die Entwicklung möglichst anwenderfreundlicher Testformate im Mittelpunkt.

Für Labor gestützte Untersuchungen wurden schon sehr früh beispielsweise Radioimmunoassays (RIA) oder Enzym gekoppelte Tests (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) entwickelt. Beide Systeme zeichnen sich vor allem durch die Möglichkeit zur weitgehend automatisierten Durchführung und Datenaufnahme aus und den damit verbundenen möglichen hohen Probandendurchsatz. Auch hinsichtlich der Sensitivität waren diese Assay-Formen lange Stand der Technik. Die technische Entwicklung und der Drang nach weiterer Automatisierung haben in den vergangenen Jahren zur Entwicklung von Protein-Microarrays geführt, mit Hilfe derer sich inzwischen sogar mehrere Analyte gleichzeitig in einer Probe nachweisen lassen [Hetzelt, 2005]. Diesen Vorteil des Parallelnachweises boten RIA- und ELISA-Tests nicht oder nur in sehr begrenztem Umfang. Eine große Übersicht über weitere immunchemische Testsysteme findet sich bei [Wild, 1994b].

Ein weiterer Nachteil der meisten immunchemischen Nachweise ist die Abhängigkeit von Laboreinrichtungen und geschultem Personal. Wie bereits beschrieben ist es aber oft wichtig, direkt vor Ort einen Test durchführen zu können und innerhalb kurzer Zeit ein Ergebnis vorliegen zu haben. In den letzten Jahrzehnten haben sich LFD/GLISA-Testformate zu einem wichtigen Werkzeug besonders in der medizinischen Diagnostik entwickelt. In relativ kurzer

Zeit wurden für weit über einhundert verschiedene Substanzen Analyseverfahren entwickelt und erfolgreich auf den Markt gebracht. Den Weg für diese Entwicklung haben nicht zuletzt Schwangerschafts- und Fruchtbarkeitstests bereitet, die den Gehalt verschiedener Schwangerschaftshormone (luteinisierendes Hormon (LH), Follikel stimulierendes Hormon (FSH) oder humanes Choriongonadotropin (hCG)) im Urin oder Blut nachweisen. An ihrem Beispiel wurde deutlich, dass auch ungeschulte Anwender mit einem Heimtest zuverlässige Ergebnisse erhalten können. Neben diesen schon seit längerer Zeit erhältlichen Tests gibt es inzwischen auch Testkits zum Nachweis verschiedenster Infektionskrankheiten (*Streptococcus* (Strep-A), Malaria, Hepatitis B und C, HIV, diverse Parasiten), Drogentests (Kokain, Cannabis) oder Nachweise für verschiedene biochemische Markerproteine.

2.3 Anwendungsgebiete

Grundsätzlich bietet sich eine Verwendung von LFD-Testkits in allen Bereichen an, in denen die bereits beschriebenen Vorteile dieser Tests zum Tragen kommen.

Die schnelle, preisgünstige und ortsungebundene Untersuchung bestimmter Analyte kann beispielsweise in der Notfallmedizin von entscheidender Bedeutung sein. So kann z.B. dem CardioDetect®-Schnelltest der Berliner Rennesens GmbH in diesem Bereich eine wichtige Rolle zukommen. Der Test weist den Herzinfarkt-typischen Marker h-FABP (heart-Fatty Acid-Binding Protein) bereits in geringen Konzentrationen im Blut nach [Rennesens, 2006]. Mit Hilfe dieses Tests kann laut Herstellerangaben in kürzester Zeit eine eindeutige Diagnose gestellt werden, und es kann eine entsprechende Behandlung eingeleitet werden.

Eine Unterstützung können LFD-Kits auch im Bereich der medizinischen Entwicklungshilfe sein. Gerade in Entwicklungsländern stehen oft keine oder nicht ausreichende Laboreinrichtungen oder -kapazitäten zur Untersuchung von Patientenproben (z.B. Blut, Urin, Stuhl) auf Krankheitserreger zur Verfügung. Schnelltests können die Arbeit des medizinischen Personals vor Ort erheblich erleichtern. So entwickelte beispielsweise die Gruppe um van Dam einen Schnelltest für Schistosomiasis (früher Bilharziose) [van Dam, 2004], eine von Parasiten verursachte Krankheit, die gerade in Afrika, auf der arabischen Halbinsel, in Südamerika, in der Karibik und im Nahen Osten weit verbreitet ist. Schätzungen zufolge sind ca. 250 - 300 Millionen Menschen von

dem Parasiten befallen und 600 Millionen gefährdet [CDC's Division of Parasitic Diseases, 2003], [Pschyrembel, 1999], [Wikipedia, Schistosomiasis, 2006]. Einen aktuellen Bezug bekommt die Schnelltestanalytik im Hinblick auf zu befürchtende Vogelgrippe-Epidemien oder auf eine sich möglicherweise ausbreitende Pandemie. Mit LFD-Tests könnte in diesem Fall zum einen ein Nachweis des Erregervirus' H5N1 im menschlichen Körper bzw. der Ausschluss einer Infektion erfolgen. Zum anderen könnte auch verdächtiges Geflügel direkt vor Ort untersucht werden, womit ein Bogen von der humanmedizinischen zur veterinärmedizinischen Anwendung der Testsysteme geschlagen wäre.

Auch im hiesigen Gesundheitssystem können Schnelltests einen großen Nutzen haben. So können zum Beispiel niedergelassene Ärzte sehr viel schneller und kostengünstiger als mit Laboruntersuchungen ihre Diagnosen hinsichtlich bestimmter Krankheitserreger überprüfen. Im sog. „over-the-counter“-Bereich (OTC) können Patienten selbst bereits eine Diagnose oder „Vordiagnose“ stellen, die eine umfassende medizinische Untersuchung möglicherweise überflüssig macht oder zumindest früher auf Krankheitsursachen hinweist. Durch solche Maßnahmen könnten im Gesundheitswesen Kosten gespart werden [CLI, 2001], [Place, 2001/2002]. Diesen Vorteilen steht jedoch die im OTC-Bereich fehlende psychologische Betreuung der Patienten entgegen. Gerade bei schwerwiegenden Krankheitsbildern oder Infektionen (z.B. HIV, Hepatitis etc.) stellt sich die Frage, ob nicht entsprechende Tests zumindest in ärztlichem Beisein erfolgen sollten, um die psychologischen Auswirkungen eines positiven Befundes entsprechend geschult auffangen zu können und den betroffenen Patienten zu unterstützen. Auch besteht selbst bei zuverlässigen Testsystemen immer die Gefahr eines falsch-positiven Befundes. Diesen dann nachträglich zu überprüfen, überfordert mit Sicherheit die Fähigkeiten eines medizinisch ungeschulten Anwenders.

Auch abseits des medizinischen Bereichs bieten sich zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten für LFD-Tests:

In der Verbrechensbekämpfung kann beispielsweise Drogenmissbrauch direkt vor Ort festgestellt werden. Bisher waren aufwändige - und vor allem teure - Laboruntersuchungen notwendig, um verschiedene Drogen im Blut verdächtiger Personen nachzuweisen. Mit immunchemischen Tests können verschiedene Drogen auch in anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.

In der Lebensmittelanalytik können Kontaminationen von Rohstoffen oder

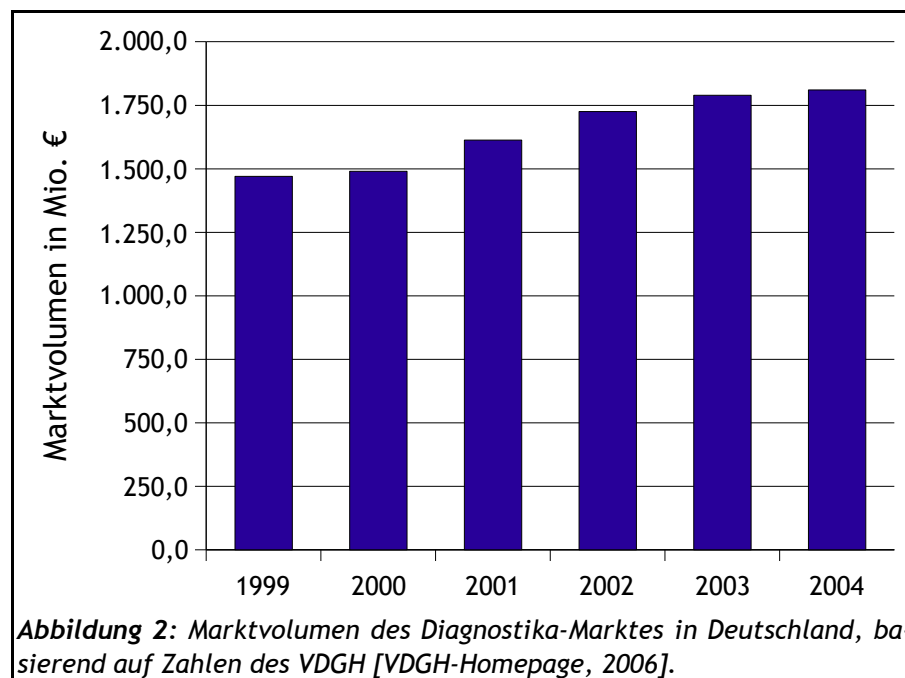
Produkten direkt vor Ort beim Erzeuger des jeweiligen Lebensmittels oder bei der weiterverarbeitenden Industrie nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit der Vogelgrippe wurde bereits auf entsprechende Möglichkeiten hingewiesen (s.o.). Auch der Einsatz hinsichtlich anderer Kontaminationen (pathogene Erreger (z.B. *Campylobacter*), Herbizide, Pestizide etc.) ist teilweise schon Stand der Technik.

Und auch die Umweltanalytik kann von der „Feldtauglichkeit“ der Schnelltestsysteme profitieren. Anhand der Wasseranalytik von Microcystin-LR wird dieser Sachverhalt auch in der vorliegenden Arbeit thematisiert werden.

2.4 Marktbetrachtungen

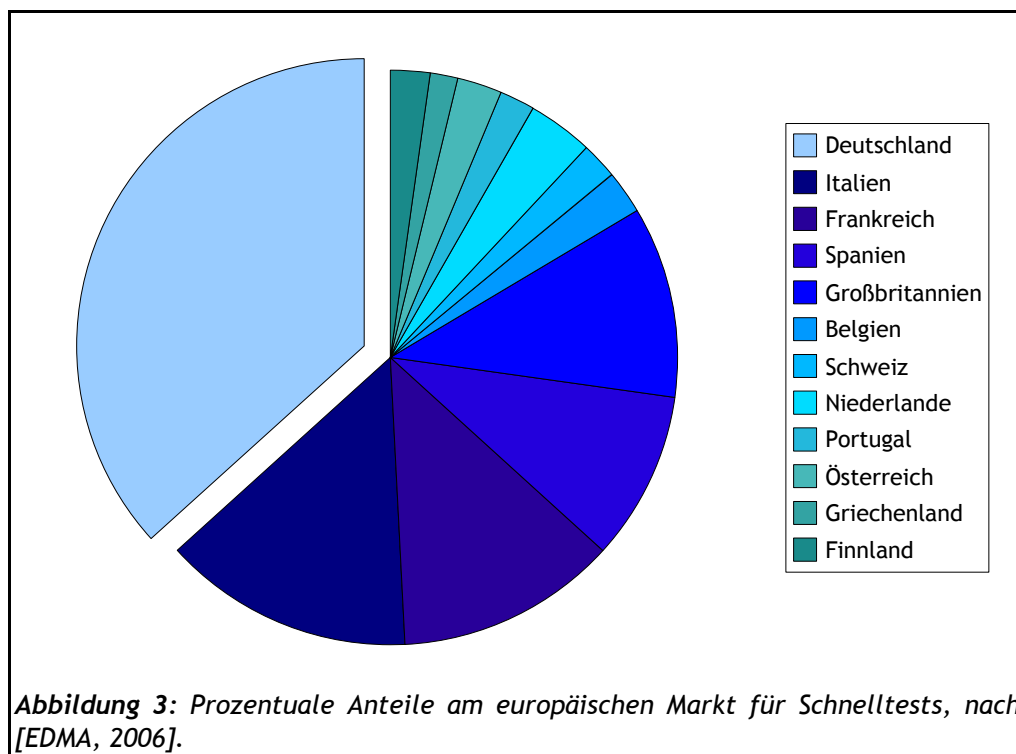
Zwar gibt es nur wenige zuverlässige Quellen über die Verbreitung und das Marktvolumen von immunchemischen Schnelltests, allen zur Verfügung stehenden Quellen ist jedoch zu entnehmen, dass die wissenschaftliche Bedeutung der *In-vitro*-Diagnostik (IVD), zu der auch immunchemische Schnelltests und LFD-Anwendungen zählen, i.A. in den vergangenen Jahren enorm zugenommen hat und auch mit einem weiteren Anstieg zu rechnen ist. Damit einher geht auch eine steigende wirtschaftliche Bedeutung dieses Marktsegments.

2002 belief sich das Weltmarktvolumen für IVD-Verfahren im humanmedizinischen Bereich nach Aussagen des Verbandes der Diagnostica-Industrie



(VDGH) auf 21,1 Mrd. US-\$. Rund 5% (entspricht ca. 1,1 Mrd. US-\$) davon entfielen auf Schnelltestverfahren. Schätzungen für das Jahr 2006 gingen damals von einem Gesamtvolumen für *In-Vitro*-Diagnostik von 29,3 Mrd. US-\$ aus. Auch wenn erwartet wurde, dass der Anteil der Schnelltestverfahren daran auf 4% fällt, wäre das absolute Marktvolumen doch auf rund 1,2 Mrd. US-\$ gestiegen [VDGH-Homepage, 2006].

Neuere Daten des VDGH zeigen für Deutschland ein Wachstum des gesamten Diagnostika-Marktes (Abb. 2). Darin sind auch immunchemische Schnelltests enthalten. Ein deutlicher Zuwachs ist erkennbar, allerdings scheint sich in den letzten Jahren eine Sättigung einzustellen [VDGH-Homepage, 2006]. Laut VDGH-Daten erlebte der gesamte IVD-Markt seit Beginn der 1990er Jahre einen Zuwachs von rund 50%. Größten Anteil daran hat der OTC-Bereich, der zwischen 1991 und 2004 eine erstaunliche Wachstumsrate von rund 750% verbuchen konnte [VDGH-Homepage].



Laut der European Diagnostic Manufacturers Association (EDMA) belief sich das europäische Marktvolumen für Schnelltests 2003 auf rund 1,7 Mrd. € [EDMA-Homepage, 2006], [EDMA, 2003]. Rund 1,5 Mrd. € davon entfallen auf OTC-Tests. Der mit rund 600 Mio. € (36,7%) größte Anteil dieses Umsatzes entfiel auf Deutschland (Abb. 3).

2.5 Verschiedene Testformate

2.5.1 Allgemeine Betrachtungen

Grundsätzlich basieren die meisten Querfließschnelltests auf immunchemischen Reaktionen, die zuvor in anderen Tests (z.B. ELISA) untersucht wurden. Allen LFD-Tests liegt der in Abb. 5 und Abb. 6 schematisch dargestellte Aufbau und das nachfolgend beschriebene Prinzip zugrunde [Tisone, 1999]. Oft wird der fragile Teststreifen mit einem robusten Plastikgehäuse umgeben (Abb. 4).

Der Anwender des Tests trägt eine im allgemeinen flüssige Probe auf ein Aufnahmepapier (Sample Pad) auf. Die Flüssigkeit wandert durch ein Reagenzienvlies (Conjugate Pad / Release Pad / Conjugate-Release Pad) und eine Polymermembran über zwei Reagenzienlinien - die Testlinie (Test Line) und die Kontrolllinie („Control Line“) - in ein weiteres Aufnahmepapier (Absorbent Pad). Der Flüssigkeitstransport erfolgt auf Grundlage der Kapillarkräfte, die die Probenflüssigkeit durch die poröse Struktur der Polymermembran ziehen.

Während des Probenflusses finden immunchemische Reaktionen statt zwischen Analytmolekülen, häufig farbig markierten Antikörpern und immobilisierten Nachweisreagenzien (z.B. Antikörper oder Moleküle, die Epitope bereitstellen), die schließlich zur Ausbildung eines Testsignals führen können (s.u.). Das Testergebnis kann nach wenigen Minuten je nach Testformat anhand einer entweder erfolgten oder nicht erfolgten Färbung des Testlinienbereichs mit bloßem Auge abgelesen werden. Anhand der Verfärbung des Kontrolllinienbereichs kann der Benutzer erkennen, ob der Test korrekt verlief.

Je nach Beschaffenheit des nachzuweisenden Analyten und der verwendeten Probe kommen verschiedene Testformate zum Einsatz. Am weitesten verbreitet sind das nicht-kompetitive Sandwich-Format und das kompetitive Format (in der Literatur oft auch als indirekter Nachweis bezeichnet). Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit diesen Formaten beschäftigt, sollen im

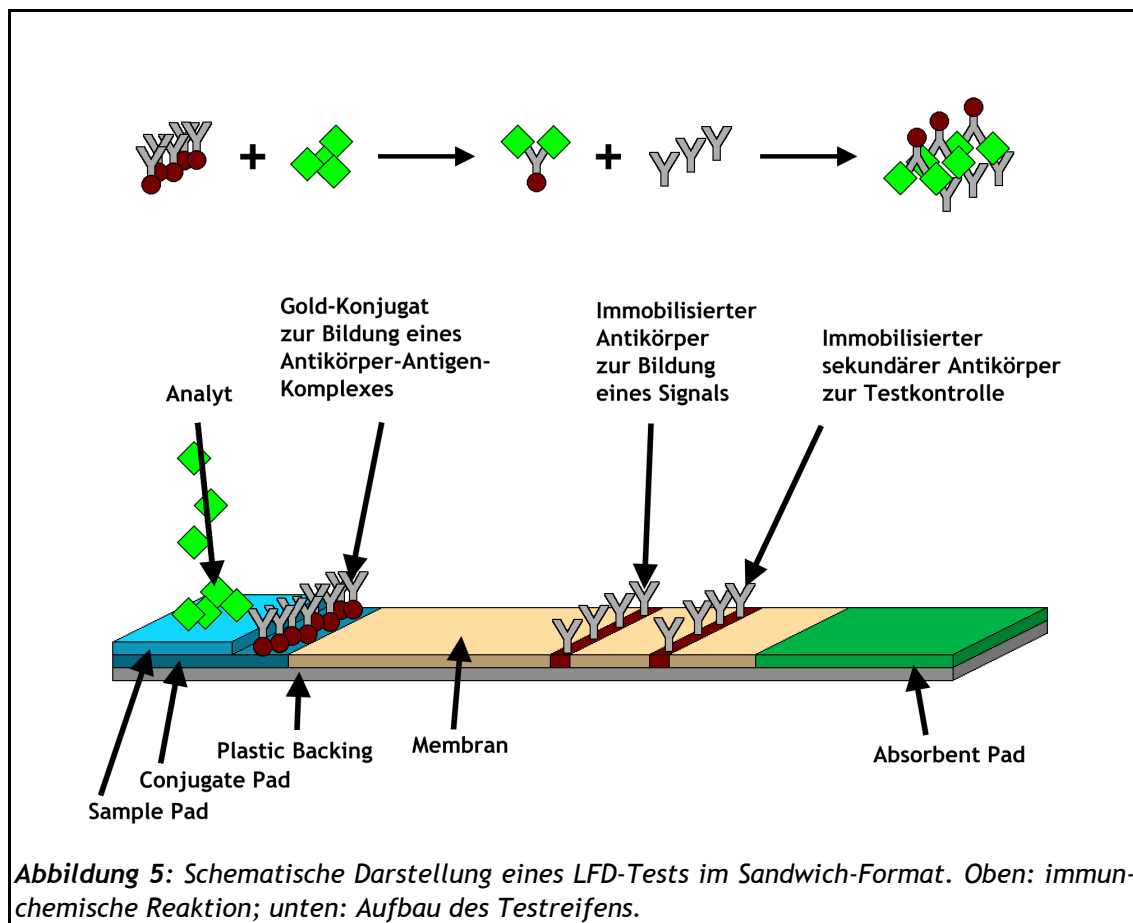


Abbildung 4: Darstellung eines typischen LFD-Tests in einem Plastikgehäuse am Beispiel des Singlepath® Campylobacter-Tests der Merck KgaA.

Folgenden auch nur diese beschrieben werden.

2.5.2 Sandwich-Format

Das Sandwich-Format kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn der nachzuweisende Analyt eine ausreichende Größe und Struktur hat, um angreifenden Antikörpern mehr als ein Epitop zu bieten. In diesem Fall können zwei spezifische Antikörper an das Analytmolekül binden und auf diese Weise den namensgebenden „Sandwich-Komplex“ bilden. Bei einem LFD-Test im Sandwich-Format wird einer der verwendeten Antikörper markiert und bei der Herstellung des Teststreifens auf dem Conjugate Pad abgelegt. Der zweite Antikörper wird als Fängerantikörper in Form der Testlinie auf die Polymermembran aufgetragen und dort immobilisiert. Durch die Probenflüssigkeit wird der auf dem Conjugate Pad eingetrocknete markierte Antikörper gelöst, und es kommt bei Vorliegen von Analytmolekülen zu einer ersten immunchemischen Reaktion. Die so gebildeten Antikörper-Antigen-Komplexe bewegen sich durch den Teststreifen über die Testlinie und binden dort. Das Testsignal entsteht

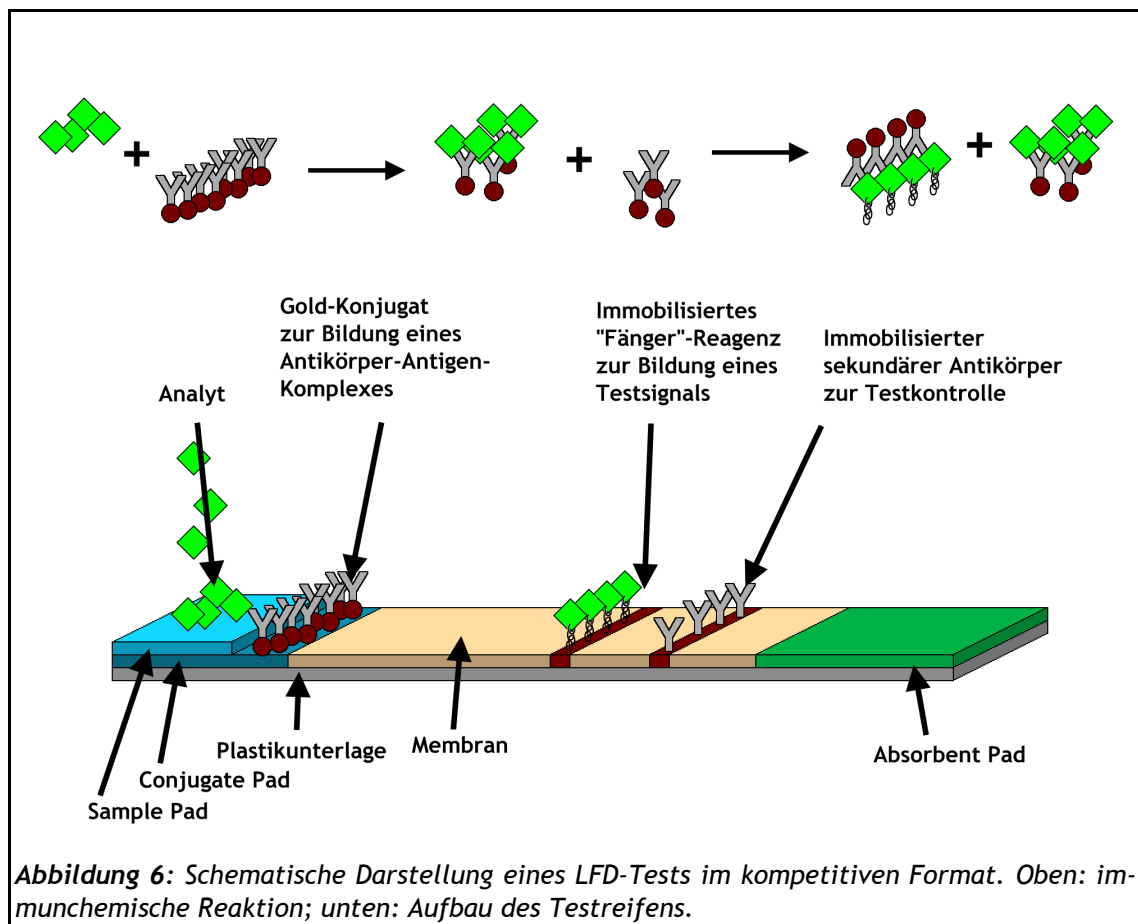


durch die Aufkonzentrierung der eingesetzten Marker auf einer relativ kleinen Fläche. Je mehr Analytmoleküle in der Probe vorliegen, desto deutlicher erkennbar wird die Färbung.

Die Probenflüssigkeit läuft schließlich auch über die Kontrolllinie. Durch einen hier immobilisierten sekundären Antikörper, der spezifisch für den verwendeten markierten Antikörper ist, werden viele der an der Testlinie nicht abgefangenen markierten Antikörper hier gebunden, was zur Ausbildung einer weiteren farbigen Linie führt. Sinn der Kontrolllinie ist es, dem Anwender zu zeigen, dass der Test grundsätzlich funktioniert hat. Das Ausbleiben eines Testsignals könnte sonst zu Missverständnissen führen.

2.5.3 Kompetitives Format

Das kompetitive Format wird dann eingesetzt, wenn die Größe und Struktur der Analytmoleküle den Angriff nur eines Antikörpers zulassen. In diesem Fall wird dieser Antikörper markiert und bei der Testherstellung auf dem Conjugate Pad abgelegt. Auf der Testlinie wird nun ein dem Analyten entsprechendes Molekül (zwecks besserer Immobilisierung häufig gebunden an größere Prote-



inreste), ein „Fänger“-Reagenz, aufgetragen.

Wie beim Sandwich-Format wird zunächst der markierte Antikörper durch die Probenlösung gelöst, und die immunochemische Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes findet statt. Auf diese Weise wird ein Teil der markierten Antikörper für weitere Reaktionen blockiert. Freie markierte Antikörper können jedoch im weiteren Testverlauf noch an die Analytmoleküle auf der Testlinie binden. Es findet in diesem Testformat also ein Wettbewerb zwischen freien Analytmolekülen und immobilisierten Analytmolekülen um die Antikörper statt. Beim kompetitiven Format verläuft die Intensitätsveränderung des Testsignals entgegen der Analytkonzentration. Je mehr Analytmoleküle in der Probe enthalten sind, desto geringer wird das Testsignal.

Ebenso wie beim Sandwich-Format fließt die Probenlösung auch beim kompetitiven Format über eine Kontrolllinie und führt zu der gewünschten Verfärbung.

2.5.4 Vergleich der vorgestellten Testformate

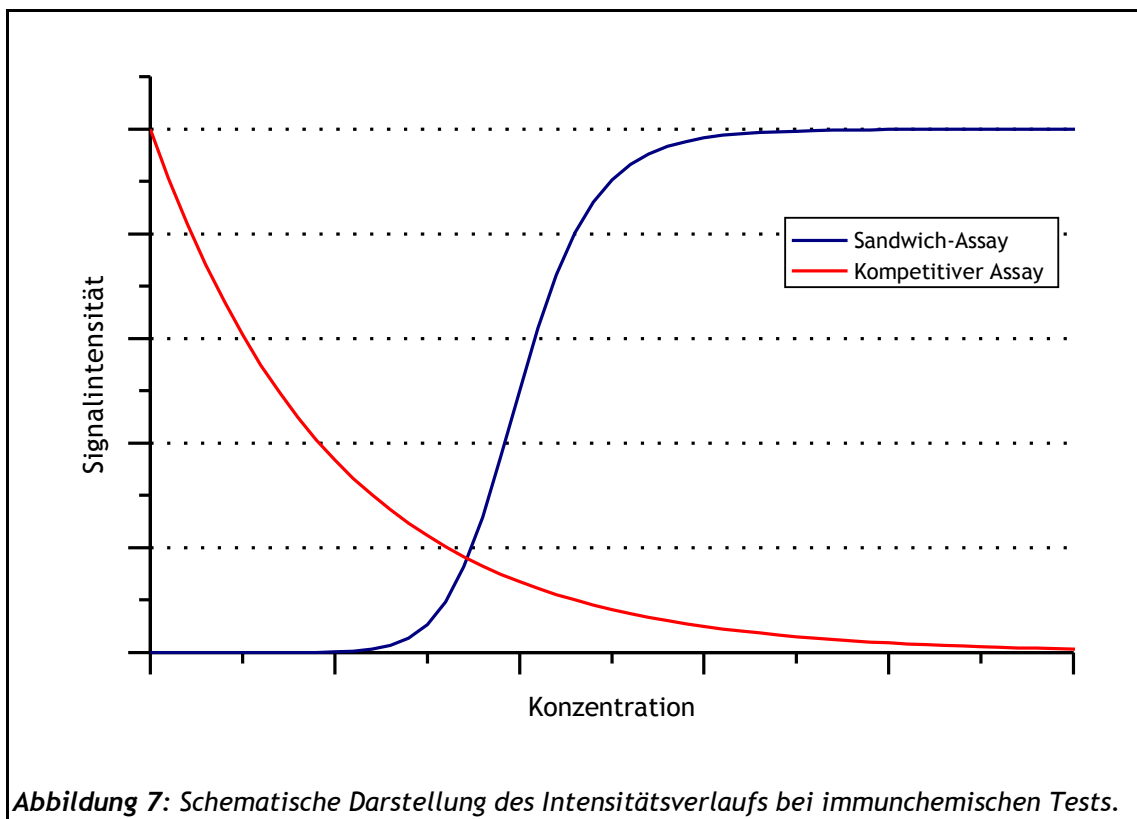
Ein Nachteil des kompetitiven Testformates gegenüber dem Sandwich-Test liegt in dem für das menschliche Empfinden unüblichen Verhalten des Testsignals. Ein ungeübter Anwender wird zunächst Schwierigkeiten haben, den umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und Testsignal zu erkennen. Um Fehler bei der Testauswertung zu vermeiden, ist es daher unbedingt notwendig, deutlich auf diesen Sachverhalt hinzuweisen.

Ein Nachteil des Sandwich-Tests liegt in der Untersuchung von Proben mit hoher Analytkonzentration. Liegen viele Analytmoleküle vor, so können diese bereits an die Testlinie binden, bevor die markierten Antikörper-Antigen-Komplexe diesen Bereich auf dem Teststreifen erreichen. Auf diese Weise werden die immobilisierten Antikörper für weitere Bindungen blockiert, und es kommt nicht zur Ausbildung der notwendigen Sandwich-Komplexe. Aus diesem auch aus anderen Testformaten bekannten Phänomen kann bei zunehmender Analytkonzentration eine Abschwächung des Testsignals resultieren, was bei der Auswertung zu Fehlinterpretationen führen kann. Sofern bei der Verwendung von Sandwich-Assays nicht ohnehin Grenzen für die Analytkonzentrationen vorliegen (z.B. beim Nachweis von Schwangerschaftshormonen), muss bei der Anwendung solcher Tests deutlich auf den analysierbaren Konzentrationsbereich hingewiesen werden. Beim kompetitiven Test tritt dieses Problem nicht auf.

2.5 Verschiedene Testformate

Im Allgemeinen verläuft die Intensitätskurve eines immunchemischen Sandwich-Tests wie in Abb. 7 gezeigt in Form einer „Dose-Response“-Kurve. Der Intensitätsverlauf kompetitiver Tests lässt sich durch ein exponentiellen Signalabfall beschreiben. Im Experimentellen Teil der Arbeit werden die hier erläuterten Grundlagen zum „Curve-Fitting“ der Testsignal-Verläufe verwendet werden. Die mit Hilfe eines Statistik-Programmes (Origin 7.5) durchgeführten Iterationen zur Ermittlung „passender“ Kurven sollen lediglich die angenommenen Kurvenverläufe anschaulich verdeutlichen. Für eine haltbare statistische Auswertung der Versuche ist die Datenbasis zu gering.

Erkennbar sind in Abb. 7 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der vorgestellten Testformate. Ein besonderes Augenmerk fällt bei der Entwicklung der LFD-Tests auf den dynamischen Bereich der Intensitätskurve zwischen einem Nullwert und einem „Vollwert“. Je nach Testformat und Anwendungsgebiet wird versucht, diesen Bereich zu verändern. Diese Veränderung erfolgt durch die Variation verschiedener Faktoren, auf die im Experimentellen Teil dieser Arbeit genauer eingegangen wird.



Meistens ist es bei beiden Assay-Formen interessant, den Beginn des dynamischen Bereichs möglichst weit in Richtung einer geringen Konzentration zu verschieben. Das ist z.B. bei hochpotenten Toxinen wie Botulinumtoxin oder den in dieser Arbeit untersuchten Giftstoffen *Staphylococcus* Enterotoxin B oder Microcystin-LR der Fall. Es kann jedoch auch interessant sein, eine bestimmte Schwellkonzentration anzuzeigen. So sollen beispielsweise Schwangerschaftstests eine Konzentration von 25 mIU/mL hCG im Urin eindeutig anzeigen können, da diese Schwellkonzentration als eindeutig für das Vorliegen einer Schwangerschaft angesehen wird [Klewitz, 2004]. In diesem Fall ist es nicht interessant, möglichst geringe hCG-Konzentrationen nachweisen zu können.

Je nachdem, ob ein klares Ja/Nein-Ergebnis (Schwangerschaftstest) gewünscht ist, oder ob der Test semiquantitativ (Toxin-Kontamination) erfolgen soll, ist entweder eine deutliche Stauchung des dynamischen Bereichs entlang der X-Achse wünschenswert oder eine entgegengesetzte Streckung dieses Bereichs entlang der X-Achse.

2.6 Vor- und Nachteile von Querfließschnelltests

Auf die Vorteile der LFD-Tests wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln intensiv eingegangen. Schnelle, spezifische, sensitive, ortsunabhängige und kostengünstige Analysen sind damit möglich. Neben diesen Vorteilen hat das System als solches aber auch Schwächen und Nachteile. Bereits erwähnt wurden schon Vor- und Nachteile der vorgestellten LFD-Formate.

Eine deutliche Schwäche gegenüber physikalischen Nachweismethoden und auch Testsystemen wie Microarrays liegt darin, dass mit jedem Teststreifen i.A. nur ein Analyt nachgewiesen werden kann. Die Anwendung eines immunchemischen Tests setzt voraus, dass bereits ein bestimmter Verdacht hinsichtlich des nachzuweisenden Stoffes vorliegt und ein dementsprechender Test zur Anwendung kommt.

Zwar ist auch der parallele Nachweis mehrerer Stoffe mit einem Test denkbar, allerdings finden diese Tests bisher nur in bestimmten Bereichen praktische Anwendung. Zudem gestaltet sich der parallele Nachweis mehrerer Substanzen schon bei der Entwicklung der Testkits schwierig, da mehrere immunchemische Systeme sehr fein aufeinander abgestimmt werden müssen, um ein optimales Testergebnis zu erhalten und Störungen durch die jeweils anderen Testkomponenten zu vermeiden. Kommerziell erhältlich ist u.A. ein paralleler

Test für Verotoxine (Merck Duopath®). Bei diesem Duopath®-System werden zwei Verotoxine tatsächlich auf einem Teststreifen nachgewiesen [Merck, 2004]. Um den hohen Entwicklungsaufwand für derartige Ein-Streifen-Tests zu vermeiden, bestehen Paralleltests oft aus mehreren Teststreifen, die in einer entsprechenden Plastikkassette zusammengefügt werden (Abb. 8).

Eine weitere Schwäche der LFD-Tests stellt die visuelle Auswertung dar. Gerade der Vorteil der Ortsunabhängigkeit resultiert ja aus der Auswertung der Testergebnisse per Augenschein. Auf diese Weise können zwar starke und schwache Testlinienintensitäten unterschieden werden, es ist jedoch kaum möglich, den verschiedenen Linienintensitäten objektiv auch konkrete Konzentrationswerte zuzuweisen. Diese Schwäche lässt sich zwar durch verschiedene Modifikationen des Testsystems (z.B. Vergleichsmessungen mit Proben bekannter Zusammensetzung, digitale Aufnahme der Teststreifen und Auswertung) umgehen, dann allerdings erhöht sich auch der Testaufwand wieder entsprechend, was wiederum die Ortsunabhängigkeit einschränkt und die Kosten erhöht.



Abbildung 8: Paralleler Nachweis von Drogen auf mehreren Teststreifen, die in einer Plastikkassette zusammengefasst sind. Abgebildet ist das Rapid Multi-Drug Test Kit der Blue Grass Drug Screen, Inc. Mit diesem Test können parallel Kokain, THC, Opiate und Amphetamine im Urin nachgewiesen werden.

Eine weitere Schwäche liegt in dem relativ großen Fehler der Methode. Exakte Messungen sind weder mit der visuellen Auswertung noch mit einer digitalen Auflichtauswertung möglich. Genauer wird auf diesen Sachverhalt im Experimentellen Teil (S. 122) eingegangen. Es gibt Bemühungen, andere Markierungsreagenzien als sichtbare Farbstoffe oder Partikel zu verwenden, und die Teststreifen mit entsprechenden Hilfsmitteln auszuwerten. So werden beispielsweise paramagnetische Partikel als Marker diskutiert, deren Einfluss auf ein anzulegendes Magnetfeld in einem Auswertegerät gemessen wird [O'Farrel, 2005].

2.7 Funktionen der Einzelkomponenten

Ausführliche Beschreibungen der Einzelkomponenten eines Querfließ-schnelltests finden sich in [Millipore, 1998], [Stückmann, 2002], [Klewitz, 2004] und [Kroll, 2004]. Zur Übersicht soll an dieser Stelle nur noch einmal kurz auf die Funktionen der Komponenten eingegangen werden, die in Abb. 5 und Abb. 6 gezeigt wurden.

2.7.1 Cellulosenitrat-Membran

Herzstück eines immunchromatographischen Schnelltests ist eine Membran aus Cellulosenitrat (CN-Membran). Für die vorliegende Anwendung zeichnet sich dieses Material durch seine hohe Bindungsfähigkeit und Bindekapazität für jegliche Proteine aus. Diese Eigenschaften werden seit Jahren auch in anderen biotechnologischen Bereichen (z.B. Blotting) eingesetzt.

CN-Membranen haben eine netzartige Struktur, die durch die Verdunstung einer CN-reichen Lösung entsteht. Diese enthält eine Flüssigkeit, in der sich CN lösen lässt (CN-Lösungsmittel), und eine Flüssigkeit, in der sich CN nicht lösen lässt (CN-Nichtlösungsmittel).

Bei der Herstellung der Membranen im Verdunstungsverfahren wird die Lösung fein auf eine glatte Unterlage aufgetragen und langsam getrocknet. Das leichter flüchtige CN-Lösungsmittel verdunstet schnell und führt in der verbleibenden Lösung zu einem Überschuss an CN-Nichtlösungsmittel. Das CN fällt aus der Lösung aus und ordnet sich faserförmig um die verbleibenden Tropfen des CN-Nichtlösungsmittels an. Ist auch das Nichtlösungsmittel

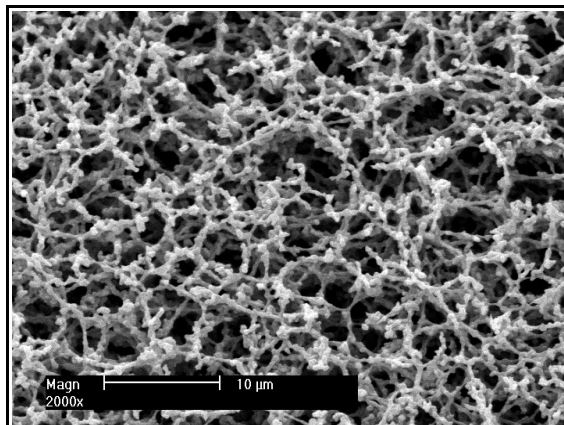


Abbildung 9: Struktur einer CN-Membran in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme.

verdunstet, bildet sich die charakteristische Netzstruktur der CN-Membranen (Abb. 9) [Sossna, 2006]. Je nach Zusammensetzung der Lösung und den Trocknungsbedingungen können verschiedene Membranstärken und Porengrößen erreicht werden.

Die Stärke der CN-Membran liegt bei LFD-Anwendungen i.A. im Mittel bei 130 µm, die Porengröße bei ungefähr 8-10 µm [Jones, 2002]. In dieser Arbeit wird allerdings gezeigt, dass auch die Verwendung von Materialien mit gerin-

geren Porengrößen sinnvoll sein kann, da die Porengrößen unmittelbaren Einfluss auf den Testverlauf haben können. Je größer die Poren sind, desto schneller fließt die Probenlösung durch die Membranstreifen und desto kürzer sind die immunchemischen Reaktionszeiten.

Die Bindung von Proteinen an die Membranstruktur erfolgt auf verschiedene Art und Weise, wobei nicht abschließend geklärt ist, welche Effekte überwiegen. Es wird davon ausgegangen, dass vor allem elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zu einer adsorptiven Proteinbindung an die Membranoberfläche führen. [Jones, 1999a, 1999b, 2002]. Die Proteine können direkt aus Lösungen adsorbiert werden, die auf die Membran aufgetragen werden. Genauere Details zum Auftrag der Proteinlösungen finden sich im Experimentellen Teil (Experimenteller Teil, Kap. 2).

2.7.2 Conjugate Pad

Der neben der Membran wichtigste Bestandteil eines Querfließteststreifens ist das Conjugate Pad. Bis auf die Test- und Kontrollreagenzien, die in Linienform auf der Membran immobilisiert sind, enthält es alle weiteren Reagenzien, die zur Durchführung des Tests benötigt werden, darunter das Detektor-Reagenz, das letztendlich die Färbung der Testlinien bewirkt, diverse Detergenzien oder Tenside, die die Benetzbarkeit der Membran für wässrige Lösungen verbessern, Blockierungsreagenzien, die die Proteinbindefähigkeit der Membran außerhalb der Testlinien verringern, sowie weitere Stabilisatoren und Promotoren [Millipore, 1998], [Klewitz, 2000], [Jones 2002], [Stückmann, 2002].

Ein Conjugate Pad sollte möglichst keine starken Bindungen zu den aufgetragenen Reagenzien ausbilden, damit diese leicht, schnell und vollständig im Flüssigkeitsstrom aufgelöst werden können. Es sollte einen gleichmäßigen Fluss der Probenlösung auf die Membran unterstützen, damit im weiteren Testverlauf keine Ungleichmäßigkeiten auf der Testlinie auftreten. Außerdem sollte das Conjugate Pad nur wenige lösliche Stoffe beinhalten, die zu Problemen beim weiteren Fluss der Probenlösung führen könnten [Millipore, 1998], [Jones, 2002].

Normalerweise werden als Conjugate Pads Glasfaser-, Papier oder Polypropylenfilter verwendet. Die Auswahl eines geeigneten Pads kann nur durch umfangreiche Tests verschiedener Materialien erfolgen [Newson, 2002].

2.7.3 Absorbent Pad

Das Absorbent Pad bildet schließlich den obersten Teil des Teststreifens. Wichtigste Aufgabe des Pads ist es, mit seiner großen Saugkraft für einen gleichmäßigen Flüssigkeitstransport durch den gesamten Teststreifen zu sorgen. Bei Verwendung eines Absorbent Pads lässt sich die durch den Teststreifen laufende Probenmenge über die Flüssigkeitskapazität der Membran hinaus erhöhen und damit die Sensitivität der Testapplikation bezüglich des Analyten vergrößern.

Nachteilig wirkt sich bei der Verwendung von Absorbent Pads aus, dass die Eigenschaften der Pads - meist saugfähige Papier- oder Cellulosefilter - schlecht vorhersagbar sind, worunter die Zuverlässigkeit des Testsystems leiden kann. So lässt sich beispielsweise die Flüssigkeitskapazität des Absorbent Pads wegen großer Schwankungen der Beschaffenheit und des Volumens der Pads nur schlecht bestimmen. Da aber die relevante Menge des nachzuweisenden Analyten mit dem Flüssigkeitsvolumen, das durch den Teststreifen gelaufen ist, zusammenhängt ($V \cdot c = m$), können Schwankungen im Testsignal möglicherweise auf die Beschaffenheit des Absorbent Pads zurückgehen [Millipore, 1998], [Stückmann, 2002].

2.7.4 Sample Pad

Ein optionaler Bestandteil eines Querfließschnelltests ist das Sample Pad. Je nach Anforderungen an die Testapplikation kann auf die Verwendung eines Sample Pads verzichtet werden. Es kann jedoch wichtige vorbereitende Funktionen erfüllen, darunter zwei Hauptaufgaben, die je nach Probenbeschaffenheit und Testablauf in unterschiedlichem Maße für die Testvorbereitung benötigt werden.

Zum einen soll das Sample Pad möglichst schnell eine möglichst große Flüssigkeitsmenge aufnehmen und diese über die gesamte Breite des Teststreifens gleichmäßig verteilen. In diesem Fall sollte das Pad aus einem saugfähigen Material bestehen, dessen Saugfähigkeit aber nicht die Flüssigkeitsabgabe an das darunter liegende Conjugate Pad behindern sollte. Zum anderen kann ein Sample Pad auch als Vorfilter für die Probenflüssigkeit fungieren und in dieser Funktion Schwebstoffe abfiltrieren, die den Testverlauf stören könnten. In diesem Fall wäre eine watteartige Konsistenz des Sample Pads angebracht.

Als Materialien für Sample Pads werden je nach Anwendung verschiedene Fasermaterialien, z.B. Cellulosefilter oder Glasfibermaterial, eingesetzt. Auch

an dieser Stelle kann die Auswahl eines geeigneten Pads nur nach umfangreichen Tests verschiedener Materialien erfolgen [Newson, 2002]. In der vorliegenden Arbeit wird deutlich werden, welche Vor- und Nachteile die Verwendung eines Sample Pads mit sich bringt.

2.7.5 Antikörper-Konjugate

Die Immunogold-Konjugation beschreibt die Möglichkeit, Antikörper an kolloidale Gold-Partikel zu binden. Aufgrund der intensiven Farbigkeit des kolloidalen Goldes auf der einen Seite und der spezifischen Bindungseigenschaften der Antikörper auf der anderen Seite lassen sich Antikörper-Gold-Konjugate hervorragend in der *In-vitro*-Diagnostik (IVD) einsetzen.

Neben Antikörper-Gold-Konjugaten werden in der IVD auch Latex-Konjugate verwendet. Diese Latex-Konjugate unterscheiden sich von den Antikörper-Gold-Konjugaten vor allem dadurch, dass sich die verwendeten Label quasi „maßschneidern“ lassen. Anders als bei den durchweg violett-rötlichen Antikörper-Gold-Konjugaten können Latex-Partikel in beinahe beliebigen Farben hergestellt werden, da die gewünschten Farbstoffe in Latex-Partikel eingebettet werden. So könnten beispielsweise auch fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden. Ebenso sind Partikel mit bestimmten Funktionen herstellbar, wie z.B. paramagnetische Partikel, deren Einfluss auf ein voreingestelltes Magnetfeld mit einem entsprechenden Lesegerät ausgewertet werden könnte. Auf diese Weise bieten die Latex-Konjugate eine größere Flexibilität hinsichtlich des zu entwickelnden Tests [Meza, 2001], [Bangs, 1999a], [Lamotte, 2002].

Die Vorteile der Antikörper-Gold-Konjugate liegen darin, dass sie weniger zur Verklumpung neigen, die die Stabilität der Konjugate herabsetzt, dass sie besser in gleichbleibender Qualität (Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit) hergestellt werden können, dass die Bindung zwischen Proteinen und Goldteilchen deutlich stärker ist als zwischen Proteinen und Latexteilchen [Chandler, 2000], [Stückmann, 2002] und dass mit ihnen i.A. eine höhere Sensitivität in den zu entwickelnden Tests erreicht werden kann [Lamotte, 2002].

Der Erfolg der Antikörper-Gold-Konjugation hängt von vielen Faktoren ab. Dazu gehören u.a. die Beschaffenheit des Goldkolloids bzw. der Latexdispersion (Größe der Partikel, Feststoffkonzentration etc.), die Eigenschaften der Antikörper und die Zusammensetzungen der verwendeten Pufferlösungen. Außerdem spielt die Verwendung diverser Hilfsreagenzien eine Rolle. Alle Fakto-

ren haben vor allem einen Einfluss auf die Bindung zwischen Antikörper und Partikel, die letztendlich für die Qualität des Antikörper-Gold-Konjugates verantwortlich ist. Weitergehende Informationen über die Konjugation finden sich in der Literatur bei [Chandler, 2000, 2001], [Robinson, 2002] und [Newsam, 2002].

Antikörper-Gold-Konjugate

Als Edukte für die Antikörper-Gold-Konjugation werden meistens ein aus Tetrachlorgoldsäure und einem Reduktionsmittel wie Natriumcitrat, Natriumborhydrid oder Natriumthiocyanat hergestelltes Goldkolloid und eine Lösung des zu konjugierenden Proteins verwendet [Chandler, 2000], [O'Farrell, 2005]. Bei der Konjugation wird i.A. die kolloide Lösung vorgelegt und die Proteinlösung dazu getropft. Da die Affinität von Proteinen zur Goldoberfläche sehr groß ist, binden die beiden Edukte sehr leicht aneinander. Zur Herstellung eines Antikörper-Gold-Konjugates in gleichbleibender Qualität ist aber eine genaue Kenntnis des Bindungsmechanismus' sehr wichtig. Allgemein wird angenommen, dass die in den verwendeten Antikörpern enthaltenen Reste der Aminosäuren Lysin, Tryptophan und Cystein einen wichtigen Einfluss auf den Bindungsmechanismus haben. Es wird vermutet, dass das positiv geladene Lysin von den außen negativ geladenen Gold-Partikeln angezogen wird, Tryptophan über hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wird und Cystein über Schwefelbrücken dative Bindungen mit den Gold-Partikeln ausbildet, bei denen sich Gold und Antikörper Elektronen teilen. Letztere scheinen auch die stärksten der beschriebenen Bindungen zu sein [Stückmann, 2002].

Interessant für die Konjugation ist nun, an welcher Stelle im Antikörper-Molekül sich die genannten Aminosäuren befinden, denn im ungünstigen Fall kann die Ausbildung mehrerer Bindungen zwischen Gold und Antikörper zu einer Verringerung der Aktivität des Antikörpers führen, wenn beispielsweise das aktive Zentrum des Antikörpers durch sterische Hinderung blockiert wird. Auch die Menge an Antikörpern, die an einen Partikel gebunden werden kann, ist eine interessante Größe. Je nach Antikörper und Partikelgröße geht man hier von einer Zahl von etwa zehn bis dreißig Antikörpern pro Goldteilchen aus. Die optimale Größe der Gold-Partikel in für Querfließschnelltests verwendeten Antikörper-Gold-Konjugaten beträgt ca. 40 nm [Robinson, 2002].

Die erfolgreiche Konjugation von Antikörpern an Gold-Partikel erfordert intensive Optimierungsschritte, denn unterschiedliche Konjugationsbedingun-

gen können sehr große Auswirkungen auf die Sensitivität, Kreuzreaktivitäten oder die Stabilität der Antikörper-Gold-Konjugate haben. Die Optimierung erfolgt i.A. durch Tests kleiner Mengen von Konjugaten, die unter verschiedenen Bedingungen hergestellt wurden [Lamotte, 2002], [Szilagyi, 2002a, 2002b, 2002c], [Kroll, 2004], [Tippkötter, 2005]. Die Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten war auch Thema der vorliegenden Arbeit und wird im Experimentellen Teil umfassend erläutert.

Antikörper-Latex-Konjugate

Bereits beschrieben wurden die Vorteile von Latex-Konjugaten gegenüber Antikörper-Gold-Konjugaten. Diese Konjugate bestehen i.A. aus Latex- oder Polystyrolpartikeln, die mit Hilfe optimierter Verfahren in guter Qualität hergestellt werden können [Bangs, 2003a, 2003b]. Die für LFD-Tests verwendeten Partikel sind größer als bei Antikörper-Gold-Konjugaten, sollten aber ein Zehntel des nominellen Porendurchmessers der verwendeten Membran nicht überschreiten, um einen optimalen Fluss zu gewährleisten [Bangs, 1999b]. Kommerziell erhältlich sind sowohl unfunktionalisierte als auch funktionalisierte Partikel. Im Experimentellen Teil dieser Arbeit wird gezeigt, dass unfunktionalisierte Partikel weniger gut für LFD-Tests geeignet sind, da in diesem Fall die zu konjugierenden Antikörper nur über adsorptive Bindungen an die Latex-Oberfläche gebunden werden. Im Gegensatz zu Gold-Partikeln besteht bei Latex jedoch keine so hohe Affinität zwischen Partikeloberfläche und Protein, sodass die resultierenden Bindungen weniger stark sind und sich Antikörper leichter wieder von der Oberfläche ablösen lassen [Bangs 1999a]. Funktionalisierte Latex-Partikel enthalten auf ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen, die unter bestimmten Bedingungen mit Aminosäure-Resten der zu konjugierenden Antikörper kovalente Bindungen eingehen. Diese sind derart stabil, dass eine Ablösung der Antikörper von der Partikeloberfläche nicht zu erwarten ist. Allerdings gestaltet sich die Herstellung der Latex-Konjugate in diesem Fall schwieriger. Es muss also abgewogen werden, mit welchem Aufwand die Konjugation betrieben werden soll, um einen entsprechenden Nutzen zu erhalten [Bangs, 2002a, 2002b]. Im Allgemeinen ist bei einer geplanten visuellen Auswertung eines LFD-Tests für einen konkreten Analyten den unkomplizierteren Antikörper-Gold-Konjugaten der Vorzug zu geben. Die Herstellung von Latex-Konjugaten lohnt sich nur, wenn deren Vorteile gegenüber Antikörper-Gold-Konjugaten für die Durchführung der Tests wirklich vonnöten sind.

3. Zielmoleküle

3.1 Auswahl der Zielmoleküle

Die Auswahl der Zielmoleküle, für die in der vorliegenden Arbeit Schnelltests entwickelt werden sollten, erfolgte auf der Grundlage verschiedener Überlegungen. Dabei spielten sowohl wissenschaftliche und kommerzielle Interessen als auch aktuelle Begebenheiten eine wichtige Rolle.

3.1.1 *Staphylococcus* Enterotoxin B

Wenige Monate vor dem Beginn der Arbeiten entbrannte in der Folge der terroristischen Anschläge vom 11. September 2001 eine intensive öffentliche Diskussion über die Gefahren, die von der Verwendung biologischer Kampfstoffe ausgehen könnten. Verschiedene Organismen und von ihnen produzierte Substanzen wurden als potenzielle Kampfstoffe eingestuft und intensiv diskutiert. Wissenschaftliche Zeitschriften wie *Clinical Microbiology and Infection* oder das *American Journal of the Medical Sciences* widmeten dem Thema Symposien und/oder Sonderhefte (CMI 8, 2002; Am. J. Med. Sci. 6, 2002). Neben einigen gefährlichen Krankheitserregern wie *Bacillus anthracis* (Milzbrand), *Yersinia pestis* (Pest) oder *Francisella tularensis* (Tularemie) [Greenfield, 2002b], werden darin auch Toxine einiger Organismen wie das Botulinumtoxin aus *Clostridium botulinum* oder die Enterotoxine des *Staphylococcus aureus* als mögliche Kampfstoffe genannt [Greenfield, 2002a]. Eine vor allem schnelle und zuverlässige, aber auch ortsungebundene Identifizierung der verwendeten Giftstoffe ist in diesem Zusammenhang unerlässlich, um einen möglichen gesundheitlichen Schaden für Mensch und Tier so gering wie möglich zu halten.

Die öffentliche Diskussion und die Tatsache, dass ein Querfließschnelltest die genannten Anforderungen erfüllen könnte, führten zur Auswahl eines Zielmoleküls aus diesem Bereich. Als Modellmolekül für die Gruppe der mikrobiologischen und/oder biologischen Kampfstoffe wurde das Enterotoxin B des *Staphylococcus aureus* (SEB) ausgewählt, da es zwar zum sog. „dirty dozen“ der biologischen Kampfstoffe gerechnet wird [Russmann, 2003], im Vergleich beispielsweise zum Botulinumtoxin oder Tetanustoxin hinsichtlich seiner Toxizität und Stabilität aber besser handhabbar ist.

3.1.2 Microcystin-LR

Die Auswahl des zweiten Analyten ergab sich aus einem regelmäßig wiederkehrenden, natürlichen Phänomen. Seit Jahrhunderten wird unter bestimmten Bedingungen die massenhafte Vermehrung verschiedener Algenarten, darunter auch Blaualgen (eigentlich Cyanobakterien), in Gewässern beobachtet. Dieses periodisch auftretende Massenwachstum wird nicht zuletzt wegen der oft intensiven Verfärbung der betroffenen Gewässer allgemein als „Algenblüte“ bezeichnet.

Unangenehme Folge dieser Algenblüte kann die Produktion von hochwirksamen Toxinen durch einige Algenarten sein. Durch die direkte Wasseraufnahme oder durch den Verzehr von vergifteten Meerestieren (Muschelvergiftung, Fischvergiftung) gelangen die gesundheitsschädlichen Verbindungen, die zu Magen-Darm-Erkrankungen, zu Leberschädigungen oder sogar zum Tode führen können, in den menschlichen Körper. Die Überwachung der Wasserqualität bzw. von Meeresfrüchten ist daher von großer Wichtigkeit. Sowohl die Lebensmittelanalytik als auch die regelmäßige Kontrolle von Badegewässern bietet interessante Anwendungsgebiete für immunchemische Testsysteme. Da herkömmliche Analysemethoden für Algentoxine sehr aufwändig, langwierig, kostenintensiv und meistens ortsgebunden sind, würden Querfließschnelltests hier eine wünschenswerte Alternative bieten.

Als Modellmolekül für den Bereich der Umwelt-/Lebensmittelanalytik wurde das Microcystin-LR des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* ausgewählt, da seine Konzentration in Gewässern häufig als Referenz für die Algenbelastung verwendet wird.

Umso geeigneter scheinen die beiden ausgewählten Analyten für eine umfassende Arbeit über immunchromatographische Querfließschnelltest-Systeme zu sein, als die sehr unterschiedliche Beschaffenheit der Zielmoleküle - und darunter vor allem die unterschiedliche Größe von ca. 1 kD (MC-LR) zu ca. 28 kD (SEB) - die Verwendung verschiedener Testformate (vgl. Kap. 2.5) erfordert. Es können so in einer Arbeit die Unterschiede und Gemeinsamkeiten verschiedener Testformate ermittelt und verglichen werden.

3.2 Details über *Staphylococcus* Enterotoxin B und Bedeutung für die Analytik

3.2.1 Herkunft und Struktur

Die *Staphylococcus* Enterotoxine (SE) gehören zu einer Gruppe von Protein-Exotoxinen, die von verschiedenen Biotypen des *Staphylococcus aureus* produziert werden.

Staphylococcus aureus ist ein weit verbreitetes, kugelförmiges, grampositives Bakterium mit einer Größe von 0,8 - 1,2 µm. Das Bakterium kann beim Menschen die oberen Atemwege besiedeln, löst dabei aber meist keine Krankheitssymptome aus. Problematisch ist die weite Verbreitung des Bakteriums in Krankenhäusern. Zum einen sind die häufig immungeschwächten Patienten intensiver von einer möglichen Infektion betroffen, zum anderen haben sich in der Krankenhausumgebung Antibiotika-multiresistente *Staphylococcus*-Stämme (MRSA-Stämme) gebildet. In manchen Kliniken beruhen bis zu 30% der im Krankenhaus erworbenen Infektionen auf MRSA-Stämmen. Besonders häufig betroffen sind die Intensivstationen der Kliniken.

In Deutschland liegt die MRSA-Rate derzeit bei etwa 20%, wobei - je nach Hygienebedingungen - starke lokale Unterschiede auftreten. Gegen MRSA-Infektionen wird standardmäßig Vancomycin eingesetzt, allerdings treten inzwischen auch schon Vancomycin-resistente Bakterienstämme auf. *Staphylococcus aureus* kann neben den bereits erwähnten Enterotoxinen verschiedene weitere Giftstoffe produzieren, darunter das TSS-Toxin (toxic shock syndrome) [Pschyrembel, 1999], [Rusnak, 2004].

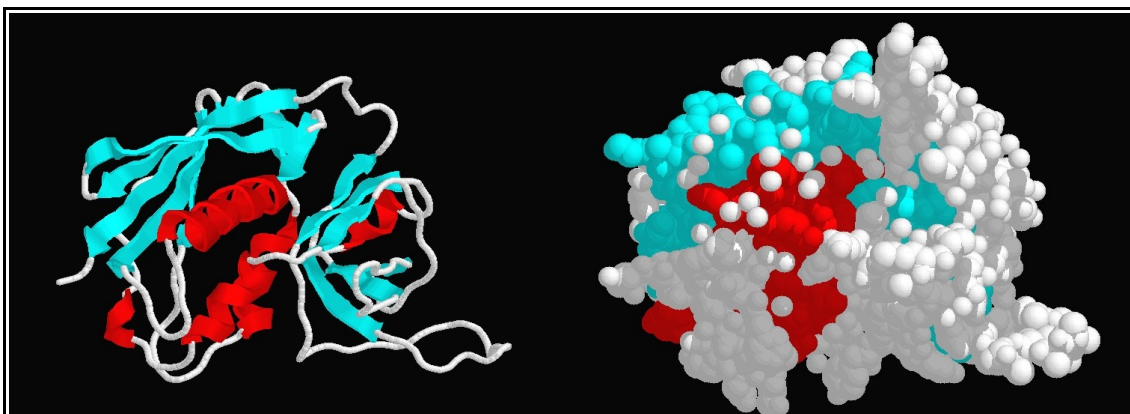


Abbildung 10: Struktur von *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) nach [Papageorgiou, 1998] und [Moss]. Markiert sind in den Darstellungen die Faltblatt- (cyan) und Helixstrukturen (rot). Deutlich erkennbar ist im Kugelmodell (rechts) die globuläre Struktur des Proteins. Die Darstellungen des Proteins wurden mit CHIME 2.6 angefertigt.

Es sind verschiedene Serotypen der SE mit teilweise mehreren Untertypen bekannt. Alle SE sind strukturell und hinsichtlich ihrer physikalischen und biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich. Sie bilden eine Gruppe globulärer Proteine mit einer Größe von 228 bis 239 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 26,4 kD bis 28,4 kD, die sehr hitzebeständig und nicht glykosyliert sind. Die SE bestehen aus einer einfachen Polypeptidkette, die eine einzelne Disulfidbrücke enthält. Die Identifizierung verschiedener SE-Serotypen schritt in der jüngeren Vergangenheit schnell voran. Während Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts erst sieben Haupttypen bekannt waren (SEA, SEB (Struktur s.a. Abb. 10), SEC1-3, SED, SEE) [Papageorgiou, 1998], waren es 1999 schon neun [Krüger, 2001] und 2002 bereits elf [Greenfield, 2002a]. Die Identifizierung weiterer Haupt- und Untertypen steht zu erwarten. Die Größe und Struktur des Proteins lässt einen Angriff von mindestens zwei Antikörpern an verschiedenen Epitopen zu. Das ist eine Grundlage für den Aufbau eines Sandwich-ELISAs und eines entsprechenden GLISAs (s.a. Kap. 3.2.3).

3.2.2 Physiologische Eigenschaften

Besondere Aufmerksamkeit haben die SE durch ihre Eigenschaft als Superantigene (SAG) erregt. Diese bifunktionellen Moleküle binden an Zelloberflächenstrukturen, die bei der normalen Antigenpräsentation und -erkennung an zentraler Stelle stehen. Die SAG vermitteln eine direkte Bindung von T-Zell-Rezeptoren und Klasse-II-Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes MHC (*engl.* von major histocompatibility complex). Die übliche, für ein Antigen typische intrazelluläre Prozessierung ist dabei nicht erforderlich.

Auf diese Weise werden unabhängig von der Antigenspezifität der T-Lymphozyten massenhaft und unkoordiniert Cytokine freigesetzt, die zu einer ganz erheblichen Entzündungsreaktion im ganzen Organismus führen (z.B. toxic shock syndrome) [Marrack, 1990], [Krüger, 2001], [Breuer, 2001], [Pschyrembel, 1999], [Krakauer, 1999], [Wikipedia, Haupthistokompatibilitätskomplex, 2006], [DocCheck/Flexicon, 2006].

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) ist die zweithäufigste Quelle für Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen, die oft nach dem Konsum von längere Zeit ungekühlten Lebensmitteln auftritt. Derartige Nährböden bieten ein hervorragendes Milieu für das Bakterium. Da SEB thermisch relativ stabil ist, wird es durch übliche küchentechnische Zubereitungsverfahren nicht zerstört [Greenfield, 2002a].

3.2 Details über Staphylococcus Enterotoxin B und Bedeutung für die Analytik

Normalerweise führt die orale Aufnahme von SEB innerhalb von ein bis vier Stunden zu ersten Symptomen und zu einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von zwanzig Stunden. Währenddessen kommt es meistens zu Übelkeit, Erbrechen, Bauch- und Magenkrämpfen und Durchfall. Manchmal können auch Kopfschmerzen und Erschöpfungszustände auftreten. Zur Auslösung dieser typischen Symptome bei gesunden Erwachsenen ist bereits eine Menge von etwa 250 - 450 ng ausreichend. Der LD₅₀-Wert bei Mäusen wird für SEB mit 27,0 µg/kg Körpergewicht angegeben (Tab. 1). Die verschiedenen SE-Serotypen verursachen prinzipiell dieselben Krankheitssymptome [Greenfield, 2002a].

Tabelle 1: Vergleich der Toxizität einiger der wirksamsten biogenen und synthetischen Toxine. Auszug aus [Russmann, 2003]. Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit behandelten Toxine.

Biogene Substanzen	LD₅₀Maus [µg/kg]	Produzent
Botulinumtoxin	0,001	Bakterium
Tetanustoxin	0,002	Bakterium
Shigatoxin	0,002	Bakterium
Ricin	3,0	Pflanze
Saxitoxin	10,0	Algen
VX	15,0	Synth. Kampfstoff
SEB	27,0	Bakterium
Microcystine	50,0	Cyanobakterien
Soman	64,0	Synth. Kampfstoff
Sarin	100,0	Synth. Kampfstoff

Bei einem Angriff mit biologischen Waffen würde vermutlich eine Intoxikation durch Inhalation des SEB vorliegen. Sie würde zu anderen Symptomen, vor allem im Atmungstrakt, führen. Fieber, Kopfschmerzen, Husten, Brustschmerzen, Luftnot und Muskelschmerzen wären die Folge [Greenfield, 2002a]. Im Fall einer Inhalation des Toxins ist der LD₅₀-Wert wahrscheinlich deutlich geringer als bei oraler Aufnahme. Quellen gehen von einem LD₅₀-Wert von nur 30 ng/kg Körpergewicht aus [Rebmann, 1999], also nur einem Tausendstel der bei oraler Aufnahme letalen Dosis.

3.2.3 Analytische Details

Die spezifische Diagnose von SEB erfordert einen Toxin-Assay des vergifteten Lebensmittels oder Wassers [Greenfield, 2002a] bzw. einer Probe des Patienten. Die Untersuchung der Probe kann dann beispielsweise mit immunchemischen Tests erfolgen.

In der Literatur werden vor allem Sandwich-ELISA-Tests beschrieben [Freed, 1982], [Morissette, 1990b], die auch kommerziell erhältlich sind. So wird der RIDASCREEN®-Test von R-Biopharm vertrieben, der TECRA®-Test von Bioenterprises Pty. Beide Tests wurden in verschiedenen Studien bzgl. ihrer Anwendbarkeit auf Nahrungsmittelproben untersucht und für geeignet befunden [Park, 1996a, 1996b]. Neben den ELISA-Tests werden seit Anfang der 1970er Jahre auch SE-Radioimmunoassays von verschiedenen Autoren beschrieben [Johnson 1971, 1972], [Collins, 1972], die auch heute noch aktuell sind. Mit unterschiedlichen Zusätzen konnten aktuell SEB-Konzentrationen von unter 1 ng/mL in Pufferlösungen nachgewiesen werden [Hetzelt, 2005]. Allerdings ist für den Anwender dieser ELISA-Tests ein erheblich höheres Maß an Vorkenntnissen notwendig als für den angestrebten LFD-Test. Auch die Testdauer ist deutlich länger als für den Schnelltest angestrebt.

Einen anderen Weg zum SEB-Nachweis geht Tempelman, der SEB in verschiedenen Medien quantitativ mittels eines transportablen fiber-optischen Biosensors nachweist [Tempelman 1996]. Mit diesem Verfahren konnten SEB-Konzentrationen von 0,5 ng/mL in Pufferlösungen nachgewiesen werden. Versuche mit dotierten Lebensmittelproben waren ebenfalls erfolgreich.

3.3 Details über Microcystin-LR und Bedeutung für die Analytik

3.3.1 Herkunft und Struktur

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den Microcystinen (MC) um Toxine, die von verschiedenen Gattungen der Cyanobakterien produziert werden. Besonders *Microcystis aeruginosa* ist für die Produktion des Giftstoffes bekannt. Daneben wird die Toxingruppe auch in Vertretern der Gattungen *Anabaena*, *Oscillatoria* und *Planktothrix* gefunden.



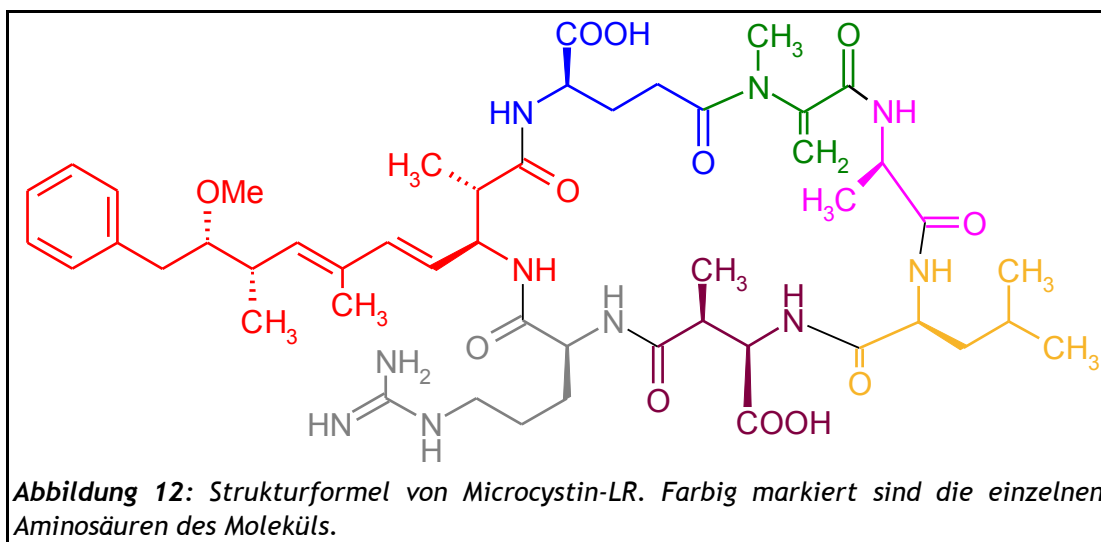
Abbildung 11: Ein typisches Bild für eine Algenblüte in einem Binnengewässer ist auf diesem Bild eines Teiches bei Harzgerode aus dem September 2005 zu sehen.

Die Giftstoffe der genannten Algenarten führen besonders dann zu Problemen, wenn die Algen sich in Folge natürlicher Einflüsse plötzlich massenhaft vermehren. Folge dieser Algenblüten, die sich je nach Witterungsbedingungen und Nährstoffangebot in dem betroffenen Gewässer meistens ein- bis zweimal im Jahr (Frühjahr und Sommer) ausbilden (Abb. 11), ist zunächst eine erhöhte Toxinkonzentration im umgebenden Wasser, die schlicht durch die erhebliche Zunahme an Biomasse ausgelöst wird. Nach dem Absterben der Zellen erhöht sich die MC-Konzentration dann noch einmal, da die zerfallenden Zellen nun ihren gesamten Inhalt in das betroffene Gewässer abgeben. Weitere Informa-

tionen über Microcystine finden sich bei [Wawra, 2005] und [Kopp, 2003].

Die Microcystine sind cyclische Peptide, die aus sieben Aminosäuren bestehen und ein Molgewicht von ungefähr 1 kD besitzen. Charakteristisch für die ganze Gruppe der MC ist die C₂₀-Aminosäure Adda (rot in Abb. 12). Sie enthält eine lange, hydrophobe Seitenkette mit vier Stereozentren, zwei konjugierten Doppelbindungen, einem Phenylring und einer Methoxygruppe. Adda ist für einige wichtige physikalische Eigenschaften der MC verantwortlich. So sorgen die konjugierten Doppelbindungen für eine charakteristische UV-Absorption bei 238 nm, und die hydrophobe Seitenkette ist für die Polarität der Moleküle verantwortlich.

MC sind in Methanol bis zu einer Konzentration von ungefähr 20 g/L löslich. Die Löslichkeit sinkt in der Reihenfolge Wasser, DMSO, Acetonitril und Ethanol.



Die erste Strukturaufklärung eines Microcystins erfolgte 1984 mittels NMR-Spektrometrie. 1998 waren bereits rund 50 Microcystine charakterisiert [Dawson, 1998]. Heute sind es rund 90 Varianten, die sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der räumlichen Stellung einiger Aminosäuren unterscheiden. 1996 gelang die erste Totalsynthese von MC-LA. Die geringen Syntheseausbeuten der bisher durchgeführten Totalsynthesen verbessern allerdings die kommerzielle Verfügbarkeit von Microcystinen nicht. Meistens werden die in der Analytik und Synthese verwendeten MC-Standards aus Cyanobakterien isoliert. Die schwierige Isolierung und Auftrennung der sehr ähnlichen MC-Varianten führt dazu, dass nur wenige Microcystine in Reinform erhältlich sind und das auch nur zu einem relativ hohen Preis [Zeck, 2001]. Zu

einer weiteren Verknappung der kommerziellen Verfügbarkeit von MC hat die Biowaffendiskussion geführt. Auch die MC wurden und werden als potenzielle Biowaffen angesehen.

Der mit Abstand häufigste natürlich vorkommende Vertreter der Gruppe ist das Microcystin-LR (MC-LR, Abb. 12). Es soll daher in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem dienen.

3.3.2 Physiologische Eigenschaften

Toxine werden sowohl nach ihrem Ursprungsort als auch nach ihrem Wirkungsort im jeweiligen Zielorganismus in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Microcystine gehören zur Gruppe der Hepatotoxine (Hepato- = Leber-), da die eigentlich nicht zellmembrangängigen MC über einen nur bei Leberzellen existierenden speziellen Membrantransport in diese Zellen gelangen. Sie reichern sich dort an und schädigen das Cytoskelett. Die Zellen werden destabilisiert, und es dringt Blut in die Leber ein.

Eine MC-Vergiftung äußert sich beim Menschen durch Durchfall, Erbrechen, allergische Reaktionen und Blässe. Die Schwere der Symptome ist dabei von der aufgenommenen Menge an MC abhängig. Grundsätzlich kann eine MC-Vergiftung auch zum Tode führen. Der LD₅₀-Wert liegt je nach Verabreichungsweg bei 25-5.000 µg/kg Körpergewicht bei Mäusen und Ratten (Tab. 1, Tab. 2). Die eigentliche Todesursache bei einer MC-Vergiftung ist letztlich ein hämorrhagischer Schock (innere Verblutung), der ein bis drei Stunden nach der Verabreichung des Toxins eintreten kann [Dawson, 1998], [Zeck, 2001].

Tabelle 2: Unterschiedliche Toxizität von MC-LR, abhängig vom Aufnahmeweg. Nach [WHO, 1999].

Aufnahmeweg	LD ₅₀ Maus [µg/kg]
intraperitoneal	25 - 150
intranasal	500
oral	5.000

3.3.3 Analytische Details

Es wurden verschiedene Möglichkeiten publiziert, Microcystine nachzuweisen, darunter immunchemische (ELISA), biochemische (Enzyminhibierungsassay [Fontal, 1999]) und physikalisch-chemische wie die Massenspektrometrie [Dawson, 1998] oder die HPLC. Auch Mischformen wie immunchromatographische Methoden wurden vorgestellt [Kondo, 2000]. Gerade die immunchemischen und biochemischen Methoden zeichnen sich aber durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität aus. MC-Konzentrationen bis in den niedrigen ppb- bzw. ppt-Bereich (ng/mL bzw. pg/mL) sollen nachweisbar sein [McDermott, 1995],

[Zeck, 2001]. Schwierigkeiten zeigten sich demgegenüber beispielsweise bei der HPLC, da die Vorbereitung und Extraktion einer geeigneten Probe einen erheblichen Aufwand darstellt [Ramanan, 2000], [Noack, 2005].

Neben den spezifischen *In-vitro*-Nachweisen ist auch immer noch der *In-vivo*-Maus-Bioassay als unspezifische Analysemethode verbreitet. Dabei wird Versuchstieren eine definierte Menge einer möglicherweise kontaminierten Probe verabreicht. Es wird festgestellt, welche Symptome die Versuchstiere zeigen sowie ob und wann sie sterben. Zwar lässt sich auf diese Weise feststellen, ob eine Probe kontaminiert ist, eine konkrete Aussage über das in der Probe enthaltene Toxin lässt sich aber nicht treffen. Dennoch gilt dieser Nachweis derzeit immer noch als Referenzanalytik für Algentoxine in Muscheln. Sowohl der unspezifische Nachweis als auch der erhebliche Aufwand für derartige Tests sowie ethische Bedenken hinsichtlich des Tierschutzes lassen intensiv über eine Substitution dieser Methode nachdenken [BfR, 2005], [LaborPraxis, 2005].

Eine umfassende Zusammenstellung der Methoden zur Analyse von Algentoxinen wurde von Kopp zusammengestellt [Kopp, 2003].

III. Experimenteller Teil

1. Antikörper-Gold-Konjugate

Ein Teil der in diesem Kapitel geschilderten praktischen Arbeiten wurde im Rahmen von Master- und Diplomarbeiten am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover angefertigt [Kroll, 2004], [Tippkötter, 2005]. Zunächst sollten dabei anhand von Modellsystemen die Herstellung von Gold- und Latex-Konjugaten genauer untersucht werden und erfolgreiche Herstellungsprotokolle entwickelt werden. Die Ergebnisse sollten dann nach Möglichkeit auf die anderen Testsysteme angewendet werden.

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

1.1.1 Versuche mit einem Maus-anti-Maus-Testsystem

Um die Eigenschaften der verwendeten Antikörper im weiteren Verlauf deutlich zu kennzeichnen, wird entweder die in nebenstehender Tab. 3 erläuterte Nomenklatur verwendet (anti-Antigen_{Produzent}) oder der Antikörper wird anhand seiner konkreten Bezeichnung (Klon XY bzw. Produktnummer) benannt. Diese wird aus den Angaben der jeweiligen Hersteller übernommen.

Tabelle 3: Verwendete Nomenklatur für Antikörper und Beispiele.

anti-	Antigen	Produzent
anti-	MC-LR	Maus
anti-	SEB	Kaninchen
anti-	Maus-IgG	Schaf

Um die grundsätzlichen Möglichkeiten zur Antikörper-Gold-Konjugation von Antikörpern zu untersuchen, soll zunächst ein vereinfachtes Modellsystem verwendet werden. Auf immunchemische Reaktionen wird weitgehend verzichtet, und es wird lediglich ein Zwei-Komponenten-System eingesetzt, bestehend aus einem Maus-Antikörper (Maus-IgG, IgG_{Maus}) und einem anti-Maus-IgG-Antikörper aus Ziegen (anti-Maus-IgG_{Ziege}). Der IgG_{Maus} soll dabei an die Gold-Oberfläche gebunden werden, der anti-Maus-IgG_{Ziege} soll später als immobilisierter Fängerantikörper dienen.

Stabile Antikörper-Gold-Konjugate lassen sich nur unter optimalen Reaktionsbedingungen herstellen. Neben der Größe und Qualität der kolloiden Gold-Partikel, die durch die Anwendung vorgegeben werden, sind vor allem die Antikörperkonzentration sowie der pH-Wert und die Salzkonzentration des verwendeten Puffers bzw. der Gold-Lösung wichtige Einflussgrößen, die zunächst

ermittelt werden müssen.

Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration für die Konjugation

Nach Herstellerangaben ist die verwendete Gold-Lösung EM.GC 40 (Partikeldurchmesser 40 nm, British Biocell International (BBInternational)) in einem pH-Bereich von pH 5 - 9,5 stabil. Außerhalb dieses Bereichs neigen die kolloiden Partikel zur Präzipitation [BBInternational, 2004]. Da der zur Konjugation eingesetzte murine Antikörper ebenfalls in diesem pH-Bereich aktiv ist [Lottspeich, 1998], sollten durch die beschriebenen Bedingungen keine Schwierigkeiten hinsichtlich der Reaktivität und Stabilität des Antikörpers auftreten.

Der gewünschte pH-Wert der Gold-Lösung wird mit 0,1 mol Kaliumcarbonat-Lösung (K_2CO_3) bzw. 0,1 mol Salzsäure (HCl) eingestellt, wobei beide Lösungen regelmäßig frisch angesetzt werden sollten. Die pH-Bestimmung kann mit einer normalen pH-Einstab-Messkette aus Glas erfolgen. Es ist allerdings darauf zu achten, dass die unbehandelte Gold-Lösung die Poren der Elektrode verstopfen kann. Daher wird die Gold-Lösung mit wenigen Tropfen einer 1%igen Polyethylenglykol-Lösung (PEG, MW 20 kDa) als Stabilisator versetzt.

Da IgG-Antikörper bei Konzentrationen ab 2 mg/mL zur Dimerbildung neigen, ist dieser Faktor bei der Konjugatherstellung unbedingt zu beachten. Die Konzentration sollte deutlich geringer sein [Geoghegan, 1977] und bei dem vorliegenden Partikeldurchmesser etwa 0,1 mg/mL betragen [Verkleij, 1989]. Die Herstellung einer Stammlösung (1 mg/mL) erfolgt nach Herstellervorschriften, die weitere Verdünnung auf die Arbeitskonzentration erfolgt zunächst mit einem 2 mmolaren Boratpuffer, der auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wird (Adsorptionspuffer I, S. 176).

Neben den praktischen Erwägungen spielen auch Kostenbetrachtungen an dieser Stelle eine Rolle. Da bei der Konjugation ohnehin nur eine bestimmte Menge Antikörper an die Gold-Partikel gebunden werden kann und die restlichen Moleküle nicht für den späteren Test zur Verfügung stehen, sollte an dieser Stelle mit einer minimalen IgG-Konzentration gearbeitet werden, die ausreicht, um eine Destabilisierung des kolloiden Zustands der Gold-Lösung und eine daraus folgende Flokkulation zu verhindern.

Unter Flokkulation wird in diesem Zusammenhang eine durch Zugabe eines Elektrolyten ausgelöste Aggregation von Partikeln verstanden, deren Oberfläche nicht vollständig mit Makromolekülen besetzt sind. Aus der Aggregation

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

der kolloiden Gold-Partikel resultiert eine Zunahme der Partikelgröße und daraus wiederum eine Farbveränderung der Lösung von einem deutlich roten zu einem bläulichen Farbton, die auf dem Tyndall-Effekt beruht. Eine vollständige Bedeckung der Partikel wiederum stabilisiert eine kolloide Lösung auch bei Zugabe von Elektrolyten und verhindert die Flokkulation [BBInternational, 2004], [Kroll, 2004].

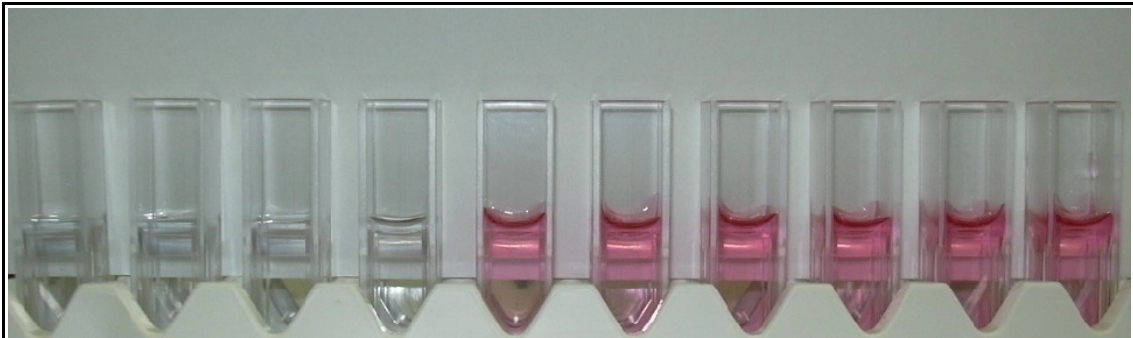


Abbildung 13: Visuelle Bestimmung der optimalen IgG-Konzentration. Die IgG-Konzentration nimmt von links (Probe 1: 0,87 $\mu\text{g/mL}$) nach rechts (Probe 10: 8,70 $\mu\text{g/mL}$) zu. Deutlich erkennbar ist der Farbunterschied zwischen Probe 4 mit einer Antikörperkonzentration von 3,48 $\mu\text{g/mL}$ und Probe 5 mit 4,35 $\mu\text{g/mL}$ (von links).

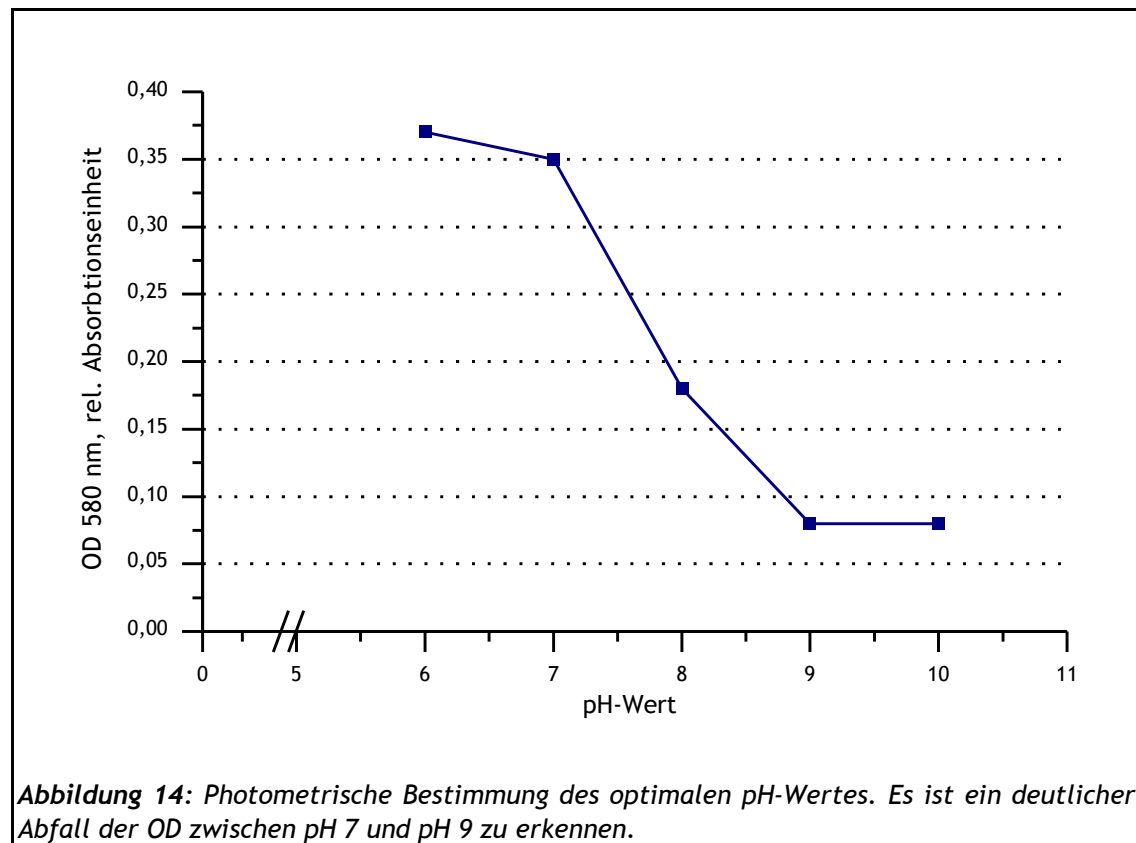
Die Bestimmung der minimalen IgG-Konzentration erfolgt mit Hilfe eines Flokkulationsversuches:

Es wird eine Reihe von jeweils 1 mL Gold-Lösung (pH 9) in 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt. Diese Lösungen werden mit einem unterschiedlichen Volumen (10-100 μL) an Antikörper-Lösung versetzt und schließlich mit Adsorptionspuffer I (S. 176) auf ein einheitliches Probenvolumen von 1,15 mL aufgefüllt. Die Proben werden kurz geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Schließlich werden zu jeder Probe 100 μL einer 10%igen (w/w) Natriumchloridlösung (NaCl) gegeben. Die Proben werden mit einem Laborschüttler für Mikroreaktionsgefäße (Vortexer) ausgiebig geschüttelt, und der Flokkulationsgrad kann entweder visuell oder mit Hilfe eines Photometers (Messung der optischen Dichte (OD) bei 580 nm) anhand einer auftretenden Farbveränderung innerhalb der Probenreihe bestimmt werden. Die erste Probe, bei der es nach Elektrolytzugabe zu keinem Farbumschlag kommt, enthält die gesuchte minimale Menge an Antikörpern für die Stabilisierung der Gold-Lösung. Im vorliegenden Fall liegt sie bei 4,35 μg Maus-IgG pro mL Antikörper-Gold-Konjugat (Abb. 13, Probe 5).

Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Antikörper-Gold-Konjugation

Bei der Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Konjugation werden die im letzten Abschnitt erhaltenen Ergebnisse verwendet. Auch in diesem Fall führen zu hohe oder zu niedrige pH-Werte zur Flokkulation der kolloiden Lösung.

Es werden fünf Proben der Goldlösung mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 6, 7, 8, 9, 10) vorbereitet, die mit der ermittelten minimalen, stabilisierenden IgG-Gesamtkonzentration von 4,35 µg/mL versetzt werden. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass die optimale IgG-Konzentration möglicherweise nur bei den Versuchsreihen mit pH 9 gilt. Die Einstellung der pH-Werte in diesem Versuch erfolgt mit entsprechend eingestelltem Adsorptionspuffer I (S. 176).



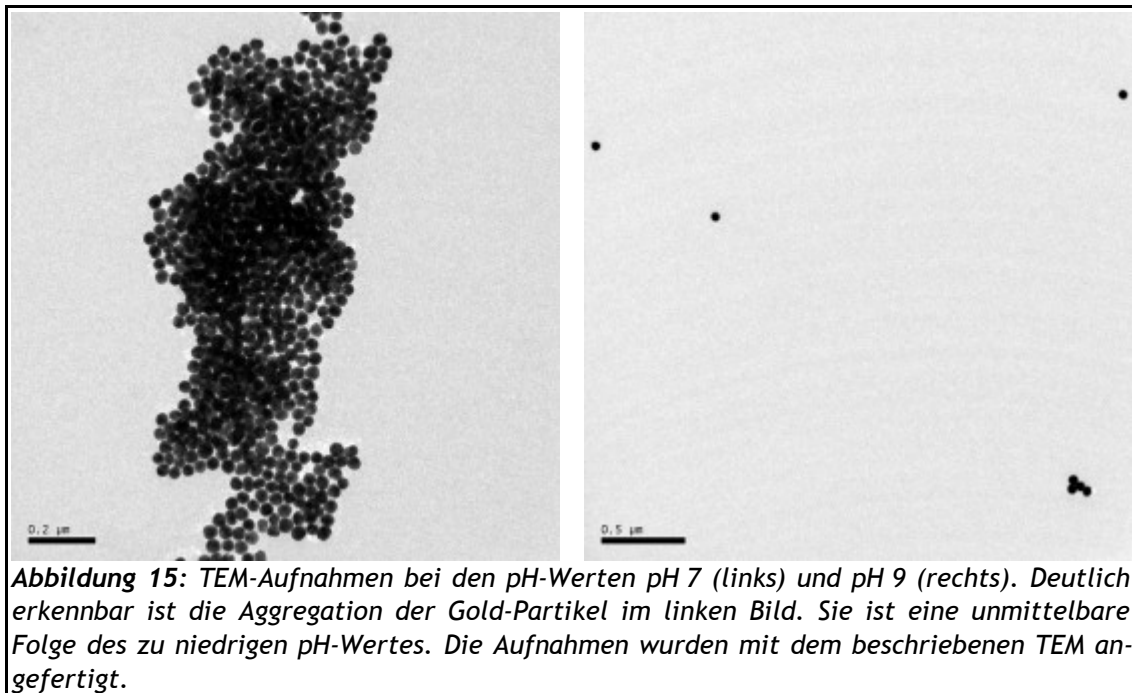
Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei RT können Farbänderungen der Probenlösungen festgestellt werden [Goodman et al., 1981]. Da eine rein visuelle Unterscheidung wegen der geringen Farbunterschiede im vorliegenden Fall schlecht möglich ist, wird hier die photometrische OD-Bestimmung bei 580 nm vorgezogen. Die Ergebnisse in Abb. 14 zeigen einen typischen Verlauf. Als stabil können die Proben mit den pH-Werten 9 und 10 angesehen werden, da in diesen Fällen keine Änderung der OD erfolgte.

Es zeigt sich, dass eine optimale Bindung der Antikörper an die Partikel am oder in der Nähe (0,5 pH-Einheiten basischer) des isoelektrischen Punktes pI des eingesetzten Proteins auftritt. Bei einem solchen pH-Wert beträgt die Nettoladung eines Proteins 0 und die Makromoleküle liegen quasi als Zwitterionen vor [Berg, 2003]. Die Moleküle sind neutral bzw. schwach negativ, so dass keine Aggregatbildung durch elektrostatische Anziehung auftritt. Außerdem haben Proteine in diesem Bereich ihre geringste Löslichkeit, und die schwach hydratisierten Proteine können leicht an die hydrophoben Gold-Partikeloberflächen binden.

Liegt der pH-Wert der Probenlösung weit über dem pI , kommt es zwischen den dann negativ geladenen Proteinen und den negativ geladenen Partikeloberflächen zur Abstoßung. Außerdem können die Proteine durch einen zu hohen pH-Wert denaturiert werden [Geoghegan, 1977], [Verkleij, 1989].

Der für die Konjugation optimale pH-Wert lässt sich auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestimmen. Dazu werden Probenlösungen mit einem Elektronenmikroskop (EM) aufgenommen. Gold-Partikel sind im EM als runde gräulich-schwarze Punkte zu erkennen. Bei hoher Auflösung lassen sich einzelne Gold-Partikel und sogar die sie umgebende Proteinhülle erkennen. Zur Untersuchung der Proben wird das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) JEM-2100F-UHR von JEOL bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV verwendet. Die Punktauflösung liegt bei 0,19 nm, die sphärische Aberrationskonstante C_s bei 0,5 mm. Diese Werte sind charakteristische Größen für Mikroskope und geben die Abbildungsgenauigkeit des verwendeten Systems an.

Zunächst werden kohlenstoffbeschichtete Grids (Firma Quantifoil Micro Tools GmbH, Carbon Support Films, Cu 300 mesh) auf einem Stück Filterpapier mit 4 μ L der jeweiligen Probe betropft. Anschließend werden die Grids fünfmal mit jeweils 4 μ L deionisiertem Wasser gewaschen, um Verunreinigungen von der Grid-Oberfläche zu entfernen. Nach kurzer Trocknung bei RT kann die Probe auf dem Grid ohne weitere Behandlung im TEM untersucht werden.



In Abb. 15 zeigt sich das Ergebnis der TEM-Aufnahmen für zwei ausgewählte pH-Werte. Bei pH 7 ist eine deutliche Aggregation der Gold-Partikel zu erkennen, während bei pH 9 nur vereinzelte Partikel sichtbar sind, die sich maximal zu Gruppen von vier bis fünf Partikeln zusammenlagern. pH 9 ist folglich besser zur Konjugation dieser Antikörper an die Oberflächen der Gold-Partikel geeignet.

In TEM-Aufnahmen lassen sich noch andere Eigenschaften der Antikörper-Gold-Konjugate zeigen. Bei hinreichender Vergrößerung können einzelne Partikel und ihre Form dargestellt werden. Es ist erkennbar, dass die Partikel nicht ideal kugelförmig sind, jedoch in ihrem mittleren Durchmesser eine annähernd einheitliche Größe zeigen. Sogar die umgebende Proteinhülle (Monolayer) kann gezeigt werden. Sie ist in Form von „Schlieren“ um die Partikel herum erkennbar (Abb. 16).

Die Dicke der zu erkennenden Proteinhülle beträgt etwa 2 nm. Dieser Wert lässt auf eine gefaltete oder „liegende“ Anordnung der Antikörper schließen, die laut Literatur eine Länge von ca. 8 nm aufweisen [Chandler , 2000].

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

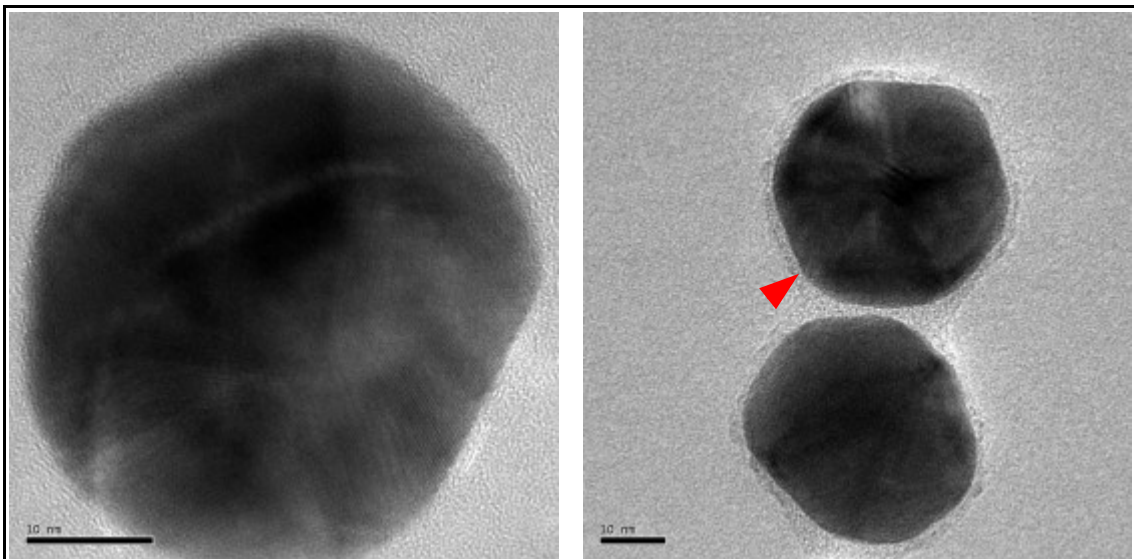


Abbildung 16: TEM-Aufnahmen einzelner Gold-Partikel bei pH 9. Im linken Bild ist ein einzelner Gold-Partikel einer Nullprobe (ohne Antikörper) abgebildet. Das rechte Bild zeigt zwei Partikel mit der sie umgebenden Antikörperhülle (Pfeil). Die Aufnahmen wurden mit dem beschriebenen TEM angefertigt.

Abschließend kann ein erstes Protokoll für die Konjugation der Maus-IgG an Gold-Partikel festgehalten werden:

Mit 0,1 mol K_2CO_3 -Lösung wird der pH-Wert der vorliegenden Gold-Lösung EM.GC 40 auf pH 9 eingestellt. 50 μ L einer IgG_{Maus}-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL in Adsorptionspuffer I (S. 176) werden in einem 200 μ L-Mikroreaktionsgefäß mit 100 μ L Adsorptionspuffer I verdünnt. Diese Lösung wird zu jeweils 1 mL der Gold-Lösung in ein 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß gegeben und mit der Pipettenspitze gut verrührt. Die Antikörperkonzentration entspricht damit 4,35 μ g/mL. Nach einem kurzen Schütteln auf dem Vortexer werden die Mikroreaktionsgefäße 1 h bei RT inkubiert. Es folgen mindestens drei Waschschrte, bei denen die Konjugat-Suspension zunächst bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert wird, der Überstand abgenommen und verworfen wird und das gebildete Pellet schließlich in 200 μ L Adsorptionspuffer I resuspendiert wird. Die Waschschrte sollen ungebundene Antikörpermoleküle aus der Konjugat-Suspension entfernen. Auf den sich während der Zentrifugation bildenden schwärzlich-glänzenden Niederschlag an den Wandungen der Mikroreaktionsgefäße wird an anderer Stelle (Kap. 1.2) eingegangen. Bei dem Niederschlag handelt es sich um Gold-Partikel, die durch die bei der Zentrifugation wirkenden starken Scherkräfte abgeschieden werden, da sie nicht ausreichend durch Proteine stabilisiert wurden.

Das finale Pellet wird schließlich in 100 μ L eines Lagerungspuffers (Lage-

rungspuffer I: 20 mmol TBS, 150 mmol NaCl, 1% (w/v) BSA (bovines Serumalbumin), 0,05% (w/w) NaN_3 , pH 8,2, S. 179) resuspendiert.

Praktische Anwendung der hergestellten Antikörper-Gold-Konjugate

Zwar war es auf die beschriebene Weise möglich, stabile Antikörper-Gold-Konjugate herzustellen, allerdings wurden diese bisher nicht auf ihre Funktionsfähigkeit in einem Querfließschnelltestsystm untersucht.

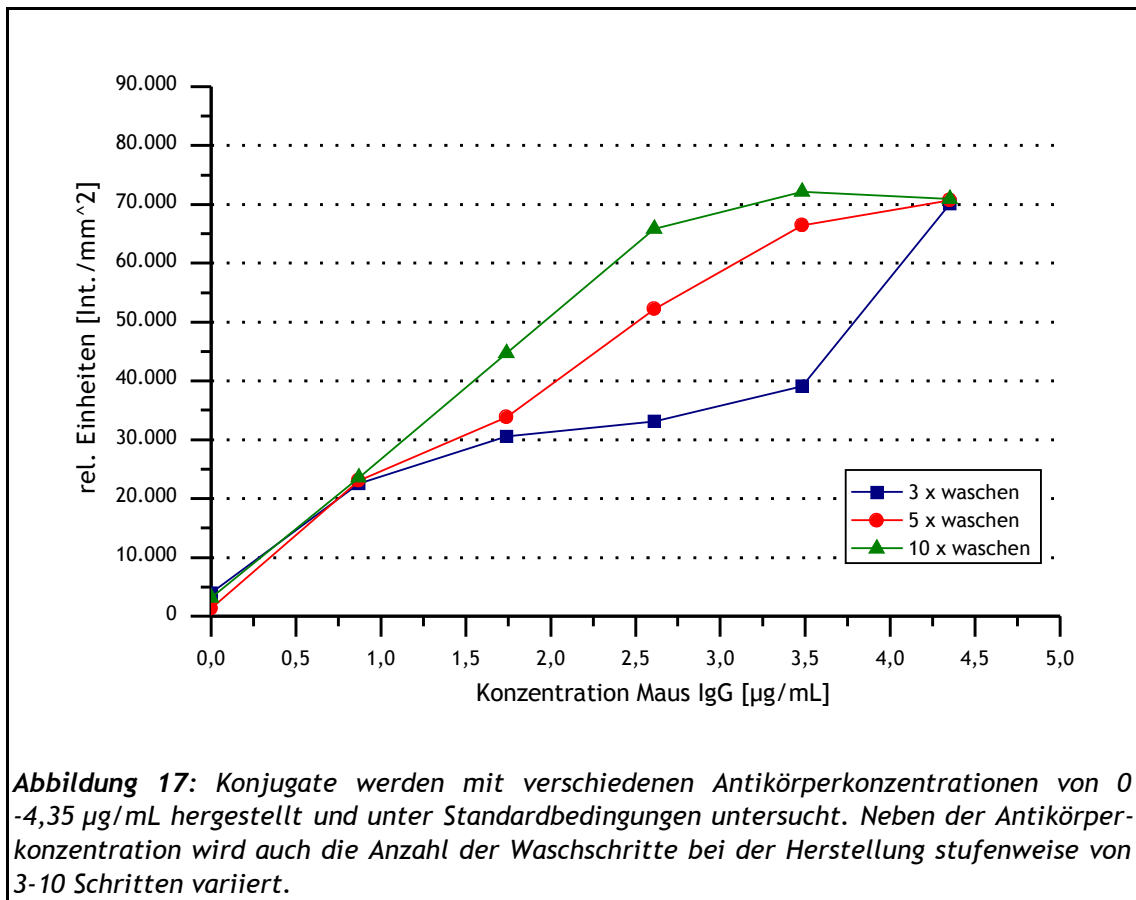
Um diesen Sachverhalt zu beleuchten, werden mehrere Antikörper-Gold-Konjugate mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen nach dem beschriebenen Protokoll hergestellt und jeweils 2 μL davon auf die Conjugate Pads von Standard-Teststreifen (s.a. Kap. 2 und Kap. 3) aufgetragen. Da neben der grundsätzlichen Funktionsfähigkeit der verschiedenen Antikörper-Gold-Konjugate in diesen Tests auch untersucht werden soll, ob die Anzahl der Waschschrirte bei der Konjugation einen Einfluss auf die Konjugatqualität hat, werden bei der Konjugatherstellung drei, fünf und zehn Waschschrirte durchgeführt. Als Fängerreagenz wird in diesen Versuchen anti-Maus-IgG^{Ziege} auf der Membran der Teststreifen immobilisiert. Dazu wird der Mab in einer Konzentration von 1 mg/mL in Applikationspuffer I¹ (S. 179) gelöst. Ansonsten werden die Testreihen unter Standardbedingungen (s.a. Kap. 3) durchgeführt und mit Hilfe der Lumibox I, einer Digitalkamera und dem digitalen Auswerteprogramm Optimas 6.5 ausgewertet. Die digitale Bildauswertung und ihre Einzelkomponenten werden genauer in Kap. 4 erläutert.

Bereits während der Testdurchführung ist eine deutliche Verfärbung der Testlinien zu sehen, die nach der digitalen Auswertung den in Abb. 17 gezeigten Kurvenverlauf ergibt. Mit der im Vorkapitel ermittelten, stabilisierenden Antikörperkonzentration lässt sich ein visuell gut erkennbares Testsignal erzeugen. Bei deutlich geringeren Antikörperkonzentrationen nehmen auch die Testsignale deutlich ab.

Erkennbar ist aus den Versuchen außerdem, dass die Anzahl der Waschschrirte bei der Konjugatherstellung einen Einfluss auf das Testergebnis hat. Je öfter das Konjugat gewaschen wurde, desto stärker sind die Testsignale zumindest ab mittleren Antikörperkonzentrationen. Bei der geringsten eingesetzten Antikörperkonzentration zeigt die unterschiedliche Anzahl an Waschschrirten keinen Effekt. Vermutlich sind bei dieser Mab-Konzentration schon zu Beginn der Waschungen sämtliche verfügbaren Antikörpermoleküle an die

1 Herstellung nach interner Prüfvorschrift, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten



Goldpartikel adsorbiert und kaum noch freie Antikörper in der Lösung vorhanden, die durch die Zentrifugations- und Waschschrte abgetrennt werden könnten. Bei höheren Antikörperkonzentrationen hingegen werden vermutlich deutlich mehr Antikörper frei in der Konjugatlösung vorliegen, die durch das ausgiebigere Waschen besser entfernt werden können. Trotz des effizienteren Waschens bleiben dennoch mehr Mab auf den Goldpartikeln haften, was zu einem deutlich besser erkennbaren Testsignal führt.

Festgestellt werden muss allerdings auch, dass die Intensitätswerte bei den Konjugaten mit einer Ausgangskonzentration von 4,35 µg/mL anti-Maus-IgG_{Ziege} unabhängig von der Anzahl der Waschschrte nahezu gleich sind. Diese Beobachtung kann nicht so recht erklärt werden. Da jedoch zwischen den Antikörper-Gold-Konjugaten mit Ausgangskonzentrationen von 3,48 µg/mL und 4,35 µg/mL anti-Maus-IgG_{Ziege} in der Versuchsreihe mit drei Waschschrten ein deutlicher Sprung auftritt, sollten die Antikörper-Gold-Konjugate bei der Herstellung mindestens fünfmal gewaschen werden, um ein deutliches Testsignal nach der Konjugatherstellung auf jeden Fall sicherzustellen.

1.1.2 Versuche mit einem hCG-Testsystem

Grundlegende Untersuchungen

Nach den erfolgreichen Versuchen mit einem einfachen 2-Komponenten-Modellsystem sollen die gewonnen Erkenntnisse zur Konjugatherstellung auf das anspruchsvollere Modell eines Schwangerschaftstest übertragen werden. Dabei soll das Hormon hCG in einer Pufferlösung durch einen Sandwich-Assay nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den bisherigen Versuchen besteht das Sandwich-Format wie beschrieben aus drei reaktiven Komponenten: dem markierten Antikörper, dem „Fänger“-Antikörper und dem Antigen hCG.

hCG-Testsysteme als solche sind aufgrund ihres Anwendungsgebietes gut bekannt, und es sollte auf diese Weise möglich sein, unbekannte Komplikationen während der Versuchsreihen auszuschließen. Genauere Informationen über hCG und das Testsystem finden sich bei [Kroll, 2004] und [Klewitz, 2004].

Für die Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates wird der für die β -Untereinheit des hCG-Moleküls spezifische murine Mab BM289 (Acris Antibodies, Hiddenhausen) verwendet. Immobilisiert wird der α -hCG-spezifische murine Mab BM901 (Acris Antibodies, Hiddenhausen) aus Applikationspuffer I¹ (1mg/mL Mab). Beide Antikörper wurden laut Herstellerangaben bereits erfolgreich in ELISA-Tests verwendet.

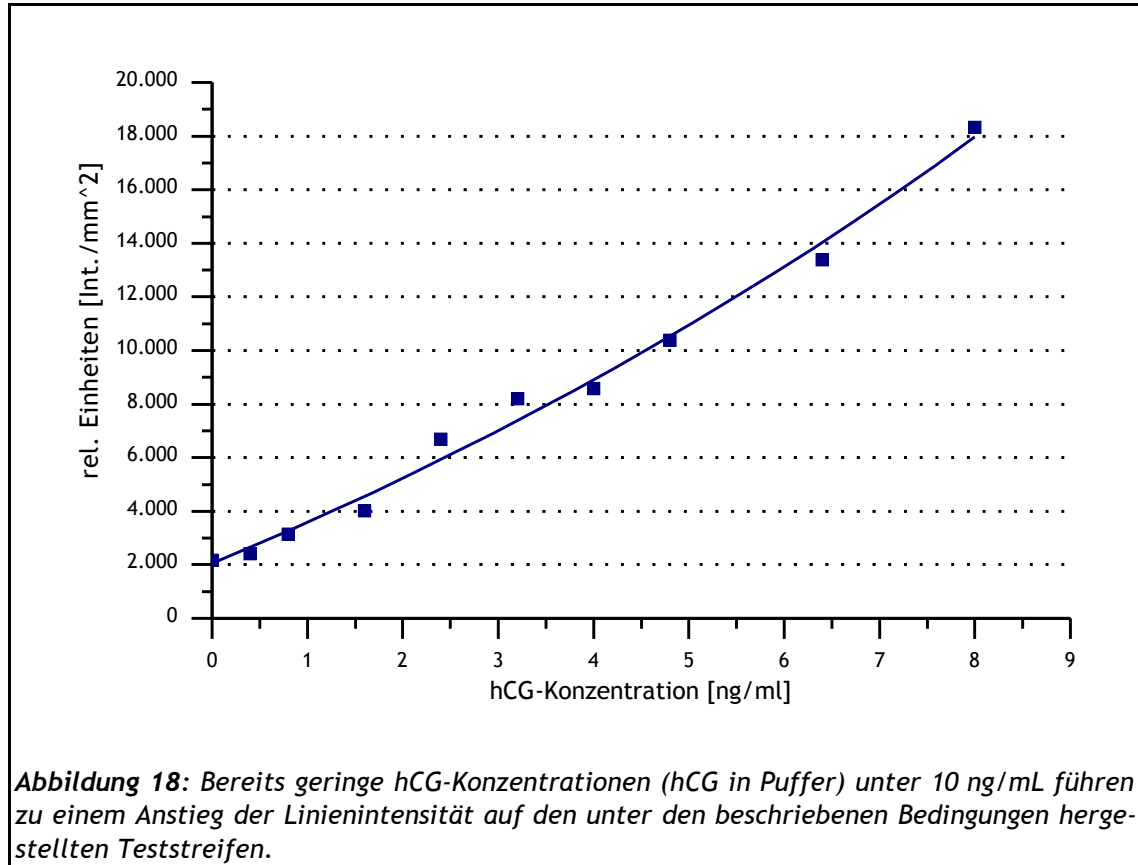
Die Bedingungen der Konjugatherstellung sollen zunächst unverändert auf das neue System übertragen werden. Lediglich die Borat-Konzentration wird auf 5 mmol erhöht. Es wird ein BM289-Gold-Konjugat mit einer Antikörper-Ausgangskonzentration von 4,35 μ g/mL im salinen Adsorptionspuffer II (5 mM Borax, 150 mM NaCl, pH 9,2, S. 176) hergestellt. Nach der Konjugation werden zehn Waschzyklen mit demselben Puffer durchgeführt, bevor das Konjugat in Lagerungspuffer I bei 4 °C gelagert wird.

Für die Tests wird eine hCG-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mIU/mL hCG in Proben-Puffer (5 mM Borax, 150 mmol NaCl, pH 9,2, S. 180) eingesetzt. Bei einer vorliegenden Aktivität von 6250 IU/mL entspricht dieser Wert einer hCG-Konzentration von 16 ng/mL. Ausgehend von dieser Konzentration werden für die Testreihen Verdünnungen von 0 bis 8 ng/mL (entspricht 0 bis 50 mIU/mL) in KPP-Puffer I (100 mM, pH 7, S. 178) hergestellt. Der Nachweisbereich eines kommerziell erhältlichen Schwangerschafts-

1 Herstellung nach interner Prüfvorschrift, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

tests liegt bei 25 mIU/mL und damit genau in dem gewählten Konzentrationsbereich. Die Testreihen erfolgen weitgehend unter Standardbedingungen (2 μ L Antikörper-Gold-Konjugat, 200 μ L Probenvolumen).



In Abb. 18 ist mit zunehmenden hCG-Konzentrationen in den untersuchten Proben auch ein Anstieg der Testlinienintensitäten zu erkennen. Diese fallen in dem nun vorliegenden Drei-Komponenten-Sandwich-Assay zwar deutlich geringer aus als in den Vorversuchen mit dem einfachen Zwei-Komponenten-System, dennoch kann bereits jetzt festgehalten werden, dass auch ein Test im Sandwich-Format mit den selbst hergestellten Antikörper-Gold-Konjugaten funktioniert. Die zuvor an dem vereinfachten System ermittelten Parameter für die Konjugation konnten dabei mit gutem Ergebnis übernommen werden.

Weitere Untersuchungen an dem beschriebenen hCG-Modellsystem werden bei [Kroll, 2004] ausführlich erläutert und sollen an dieser Stelle nicht thematisiert werden. Ein Aspekt der weitergehenden Versuche ist allerdings auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwähnenswert: die Langzeitstabilität der Antikörper-Gold-Konjugate bzw. der fertiggestellten Teststreifen.

Untersuchung der Langzeitstabilität

Bei Querfließschnelltests ist es unerlässlich, dass die fertigen Teststreifen über einen Zeitraum von mehreren Monaten stabile Ergebnisse liefern. Nur dann kommen die im Theoretischen Teil beschriebenen Vorteile der LFD-Tests zur Geltung, und ein entwickelter Test wäre mit Erfolg kommerziell verwertbar.

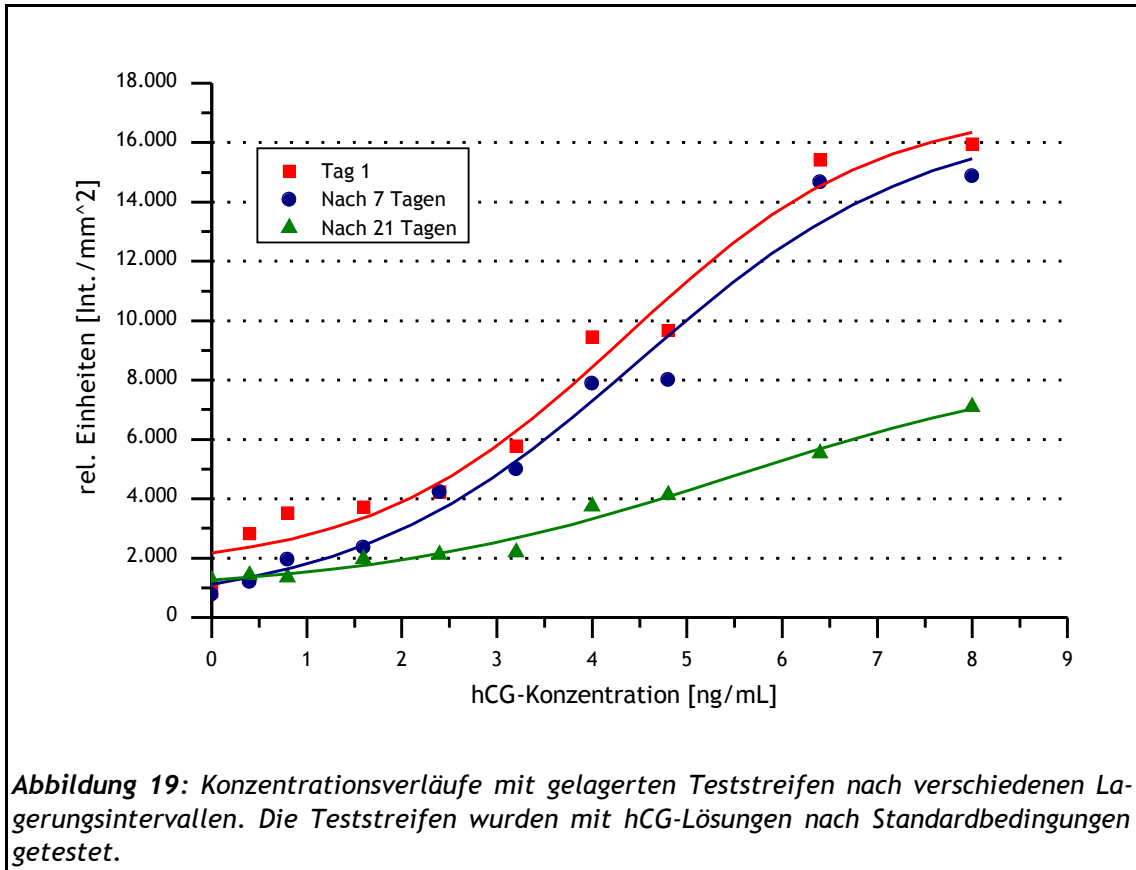
Die Langzeitstabilität des hCG-Testsystems soll anhand von zwei Methoden untersucht werden. Zum einen soll das hergestellte Antikörper-Gold-Konjugat über einige Tage in Lagerungspuffer I (S. 179) aufbewahrt und danach frisch aufgetragen auf Teststreifen untersucht werden. Zum anderen sollen die vollständigen, bereits mit Antikörper-Gold-Konjugat versehenen, Teststreifen eingelagert und im Anschluss ebenfalls untersucht werden. Beide Proben sollen jeweils unter Luftabschluss (Mikroreaktionsgefäß/Plastikfolie) bei 4 °C aufbewahrt werden. Es wird zunächst von einer überschaubaren Lagerungszeit von 3 Wochen ausgegangen. Auf eine Lagerung unter beschleunigenden Bedingungen (Temperatur \gg RT, hohe Luftfeuchtigkeit) muss mangels Möglichkeiten einer definierten Lagerung verzichtet werden, da keine entsprechenden Klimakammern zur Verfügung stehen. Die anschließenden Untersuchungen der Teststreifen erfolgen an den bereits im Vorkapitel beschriebenen hCG-Proben (hCG in Borat-Puffer, S. 180, verdünnt mit KPP-Puffer I, S. 178).

In Abb. 19 ist deutlich erkennbar, dass die Sensitivität des gelagerten Antikörper-Gold-Konjugates bereits nach einer Woche leicht und nach drei Wochen deutlich abnimmt. Die zugehörigen Kurven werden mit zunehmender Lagerungszeit deutlich flacher. Der Intensitätsunterschied zwischen den mituntersuchten Nullproben und niedrig konzentrierten hCG-Proben verringert sich drastisch. Die Nachweisgrenze der Tests, an der noch eine sichere Unterscheidung von Nullprobe und hCG-Probe stattfinden kann, verschiebt sich von <1 ng/mL hCG auf über 3-5 ng/mL, und auch bei höheren hCG-Konzentrationen bleiben die Intensitätsunterschiede gering. Ein zuverlässiger hCG-Test ist mit dem gelagerten Antikörper-Gold-Konjugat nicht mehr möglich.

Die Sensitivitätsabnahme des gelagerten Antikörper-Gold-Konjugates lässt sich auf der Grundlage zweier Annahmen erklären: Zum einen kann die Lagerung des Konjugates im Lagerungspuffer I (S. 179) ohne weitere Stabilisatoren wie größere Mengen BSA oder PEG dazu geführt haben, dass sich die adsorptiven Bindungen zwischen Antikörper und Gold-Partikeloberfläche gelöst haben

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten

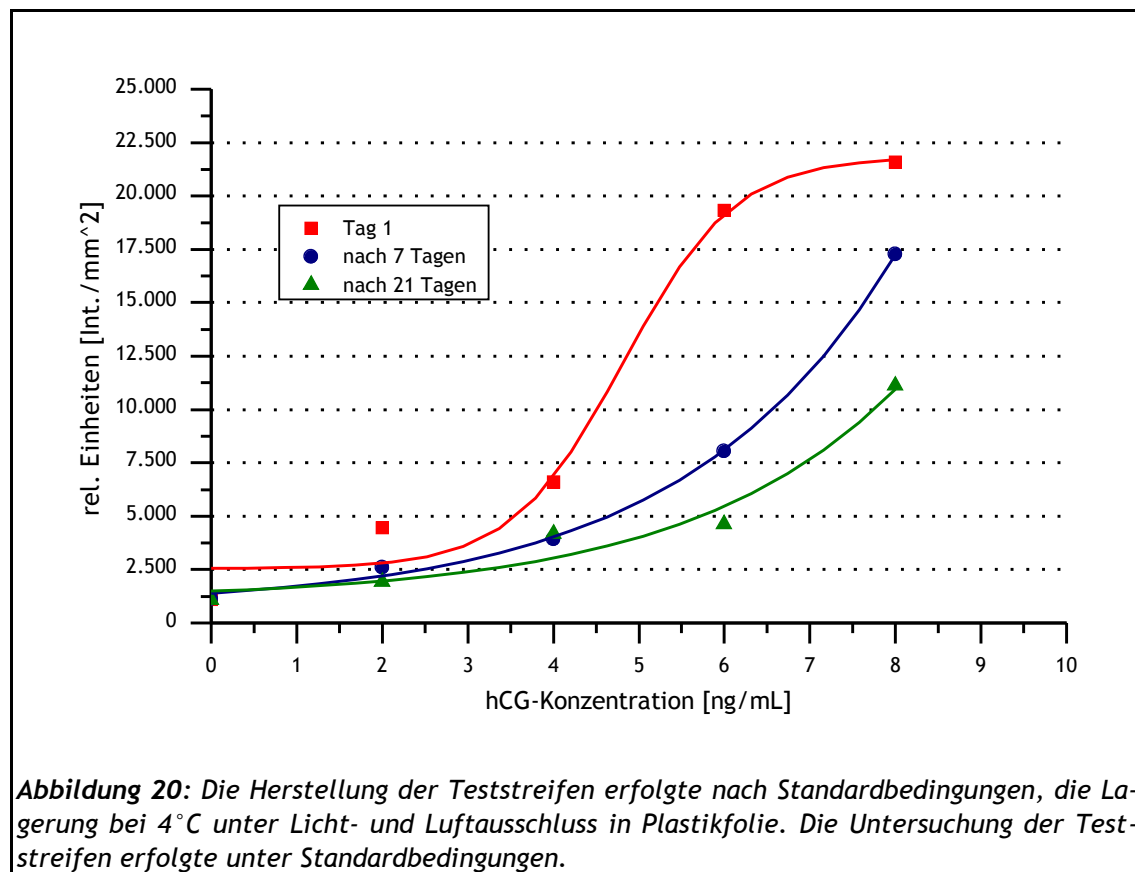
und die Antikörper sich unmarkiert in der Konjugat-Suspension befanden. Zum anderen können auch die Lagerungsbedingungen die Aktivität der Antikörper durch langsam fortschreitende Denaturierung vor allem der wichtigen Bindungsbereiche herabgesetzt haben.



Ebenso kann unter den gewählten Lagerungsbedingungen eine Anlagerung der Konjugat-Bestandteile (Antikörper, Gold-Partikel) an das Material des Conjugate Pads stattgefunden haben, sodass das Konjugat nicht mehr durch die Probenflüssigkeit resolvasiert werden konnte.

Die zweite Testreihe mit fertigen Teststreifen zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 20). Auch in diesem Fall nimmt die Sensitivität der Teststreifen stark ab. Unter diesen Bedingungen ist bereits nach einer Woche eine so starke Intensitätsabnahme der Testsignale erfolgt, dass die Teststreifen für einen realen hCG-Test nicht mehr zuverlässig eingesetzt werden könnten.

1.1 Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten



Fazit

Während der Versuche zur Herstellung eines Antikörper-Gold-Konjugates für einen Sandwich-GLISA konnte gezeigt werden, dass der zuvor festgelegte Entwicklungsweg der Antikörper-Gold-Konjugat-Herstellung vom einfachen 2-Komponenten-Modellsystem zum Sandwich-Assay sinnvoll war. Mit vergleichsweise einfachen und kostengünstigen Voruntersuchungen konnten zunächst wertvolle grundlegende Erkenntnisse über die Konjugatherstellung gesammelt werden, die sich auf ein anspruchsvolleres System anwenden ließen. Basierend auf den Grundlagen konnte ein funktionierendes Testsystem entwickelt werden, an dem erste Untersuchungen hinsichtlich der Lagerungsstabilität des Konjugates bzw. der gesamten Teststreifen vorgenommen werden konnten. Trotz dieses Etappenerfolges bieten sich bei dem bestehenden System etliche Optimierungsmöglichkeiten hinsichtlich des Herstellungsprotokolls, der Signalintensität und der Langzeitstabilität.

Vor allem die Ergebnisse der durchgeführten Lagerungstests zeigen einen deutlichen Optimierungsbedarf. Das an sich funktionierende hCG-Schnelltestsystem büßt seine entscheidenden Vorteile ein, wenn es vor jeder anstehen-

den Untersuchung frisch hergestellt werden müsste. Der Schnelltest böte dann keine nennenswerten Vorteile mehr gegenüber den im Theoretischen Teil beschriebenen anderen Laboruntersuchungen.

1.2 Optimierung der Konjugat-Qualität

Wie bereits beschrieben bietet das entwickelte Herstellungsprotokoll für die Antikörper-Gold-Konjugate deutliches Optimierungspotential. Im Fokus sollte dabei eine möglichst effiziente (zeit- und kostenoptimierte) Konjugat-Herstellung stehen, die dennoch ein qualitativ möglichst optimales Antikörper-Gold-Konjugat bietet. Auf verschiedene Optimierungsschritte wird in den folgenden Unterkapiteln genauer eingegangen werden.

1.2.1 Optimierung der Herstellungsdauer

Eine ausführliche Beschreibung der Optimierung findet sich bei [Tippkötter, 2005]. Genauere Angaben zum endgültigen Herstellungsprotokoll werden in dieser Arbeit im Anhang, Kap. 1 (S. 165) erläutert. An dieser Stelle soll nur die zur Herstellung des Konjugates benötigte Zeit betrachtet werden.

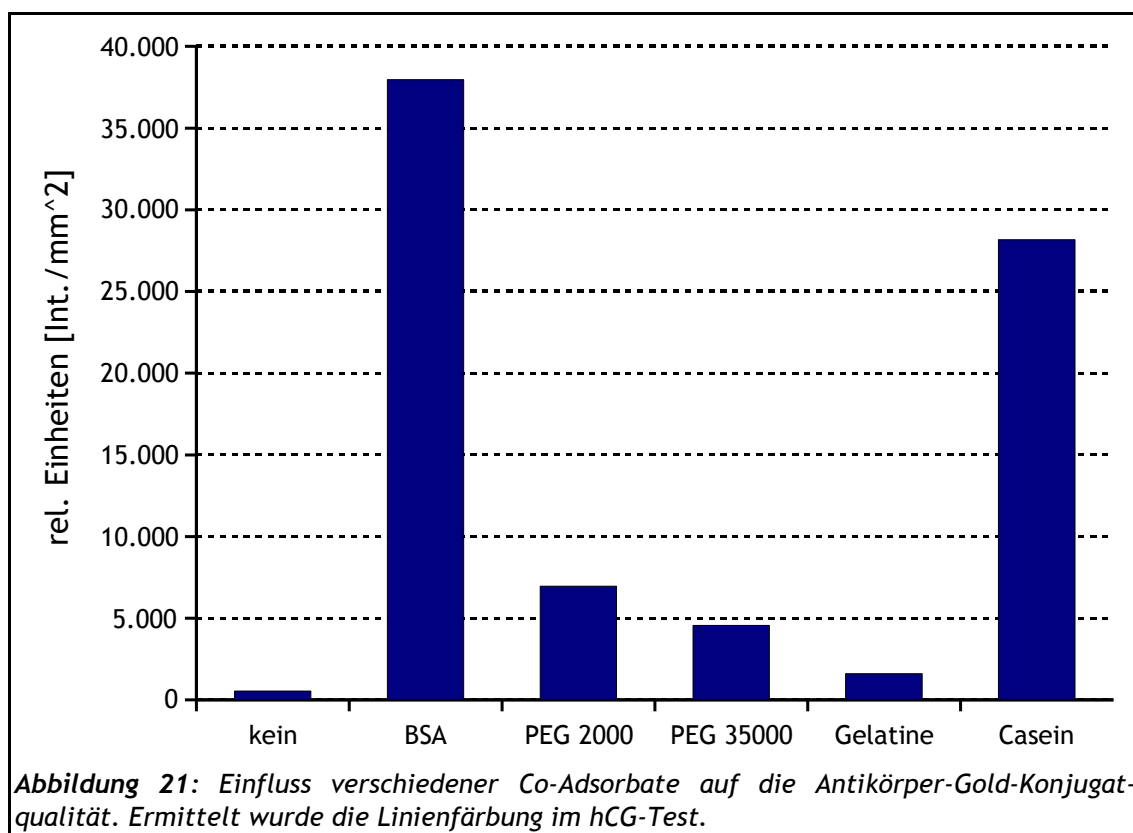
Im endgültigen Konjugationsprotokoll kann die Inkubationszeit von Antikörperlösung und Gold-Suspension auf mindestens 40 min festgelegt werden. Nach einer weiteren 20-minütigen Inkubation der Konjugation-Suspension mit einer 10%igen (w/w) BSA-Lösung folgt eine 30-minütige Zentrifugation und schließlich fünf bis sechs Waschschrte bestehend aus einer 15-minütigen Zentrifugation und einer Aufnahme der jeweiligen Pellets in Lagerungspuffer I (S. 179). Zusammengenommen wird auf diese Weise eine Herstellungsdauer von 3,5 bis 4 h für bis zu fünf „Mini“-Chargen (je ein Mikroreaktionsgefäß) des Antikörper-Gold-Konjugates erreicht.

1.2.2 Optimierung der Konjugationsbedingungen

Bereits bei [Kroll, 2004] wurde während der Zentrifugationsschritte bei der Konjugation ein schwärzlich-glänzender Niederschlag auf den Wandungen der Mikroreaktionsgefäße beobachtet. Bei [Tippkötter, 2005] soll durch die Zugabe von co-adsorbierenden Makromolekülen zu der Konjugationslösung eine Anhaftung nicht-stabilsierter Gold-Partikel an die Gefäßwandungen verhindert werden, da diese u.a. zu einer schwer kalkulierbaren Verringerung der Partikelkonzentration im späteren Konjugat führt. Außerdem soll durch die Modifikation des Herstellungsverfahrens auch eine garantierte Oberflächensättigung der Gold-Partikel erreicht werden, um etwaigen Störungen bei der späteren

Durchführung der Querfließschnelltests vorzubeugen. Nicht vollständig abgesättigte Gold-Oberflächen könnten zu unspezifischen Bindungen der Gold-Partikel an die CN-Membran, das Conjugate Pad oder an das Fängerreagenz (ebenfalls ein Protein) führen. Zwar enthält der Lagerungspuffer I (S. 179) für Antikörper-Gold-Konjugate bei [Kroll, 2004] bereits geringe Mengen des Co-Adsorbates BSA (1% (w/w)), diese Menge erscheint jedoch nicht ausreichend, um die beschriebene Absättigung der Goldoberfläche garantieren zu können.

Es sollen verschiedene Makromoleküle hinsichtlich ihrer Eignung als Co-Adsorbate untersucht werden. Dabei werden nach einer Konjugationszeit von 40 min (vgl. Vorkapitel und Kap. 1.1) jeweils 100 μL einer 10%igen (w/w) Polymerlösung (in Adsorptionspuffer II, S. 176) zu den Konjugationslösungen gegeben. Als Makromoleküle werden BSA, Polyethylenglykole mit verschiedenen Molekülgrößen (Massen: 2 kDa, 35 kDa), Gelatine und Casein eingesetzt. Die Inkubationszeit zwischen Polymerlösung und Konjugationslösung beträgt 30 min bei RT. Nach dieser Zeit wird das Herstellungsprotokoll mit den beschriebenen Waschschritten unverändert fortgesetzt.



Nach der Herstellung werden jeweils 3 μL der fertigen Konjugate auf hCG-Teststreifen aufgetragen und mit hCG-Proben (200 μL ; 100 mIU/mL) untersucht.

Bereits während der Zentrifugationsschritte lässt sich erkennen, dass vor allem der Zusatz von BSA Auswirkungen auf die Eigenschaften der Konjugat-Pellets hat. Diese sind deutlich lockerer und lassen sich sehr viel leichter re-suspendieren. Auch der Niederschlag auf den Gefäßwänden fällt deutlich geringer aus.

Die digitale Auswertung der Signale lässt zudem deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Co-Adsorbaten erkennen (Abb. 21). Die positivsten Effekte auf die Signalintensität im hCG-Test zeigen BSA und Casein. Die BSA-Dotierung wird aufgrund dieser Ergebnisse in das Konjugationsprotokoll aufgenommen.

1.2.3 Optimierung der Langzeitstabilität

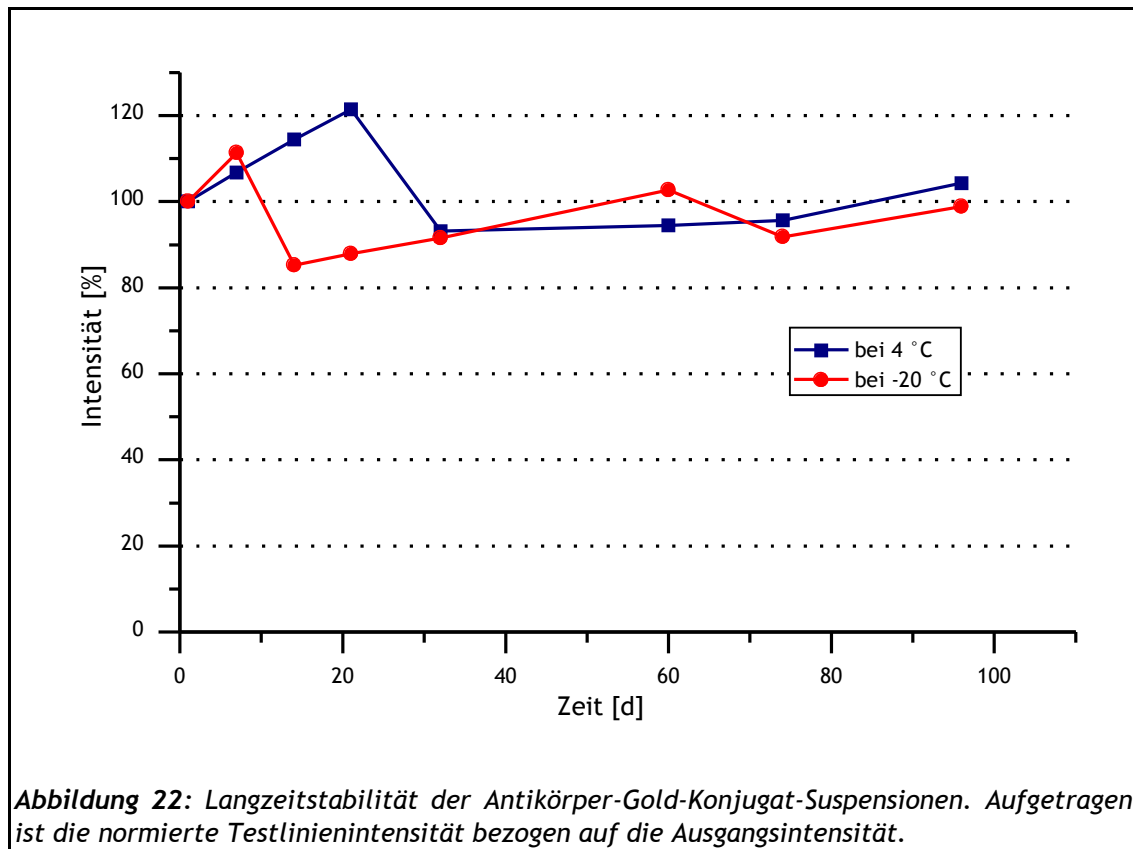
Bei den in Kap. 1.1 durchgeführten Lagerungstests wurden noch nicht sämtliche Optimierungsmöglichkeiten ausgeschöpft. So sind neben den untersuchten Lagerungsbedingungen noch weitere Modifikationen des Testsystems möglich, die bisher nicht beleuchtet wurden.

Eine Möglichkeit, die Langzeitstabilität von Antikörper-Gold-Konjugaten und/oder vollständigen Teststreifen zu erhöhen besteht darin, die Proben einzufrieren. Zwar würde ein Einfrieren der Konjugat-Suspension bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter normalen Umständen zu einer Flokkulation des Antikörper-Gold-Konjugates führen, der Zusatz von 20 bis 30% (v/v) Glycerin zum Lagerungspuffer I (S. 179) könnte das Konjugat jedoch sowohl in Lösung als auch auf den Teststreifen so stabilisieren, dass die Flokkulation ausbleibt.

Im Folgenden soll die Lagerung von Antikörper-Gold-Konjugaten und Teststreifen bei verschiedenen Temperaturen (Konjugate: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; Teststreifen: zusätzlich RT unter Lichtabschluss) untersucht werden. Die gefrorenen Proben werden vor dem Einfrieren bzw. vor dem Auftrag der Konjugat-Suspension auf die Conjugate Pads mit 20% (w/w) Glycerin versetzt. Nach bestimmten Zeitintervallen werden die Konjugat-Suspensionen bzw. die fertigen Teststreifen aufgetaut und die Teststreifen mit 200 μL einer hCG-Lösung (50 mIU/mL) untersucht.

Auch über einen längeren Zeitraum ist bei den eingelagerten Suspensionen eine unter Berücksichtigung der Messungenauigkeiten weitgehend gleichblei-

bende Farbintensität auf den verwendeten Teststreifen zu erkennen (Abb. 22). Über 100 Tage konnten die Suspensionen stabil gehalten werden. Dabei zeigt sich nur ein relativ geringer Unterschied zwischen den bei 4 °C und bei -20 °C gelagerten Suspensionen. Zu einer Flokkulation der Suspensionen kam es durch das Einfrieren nicht.

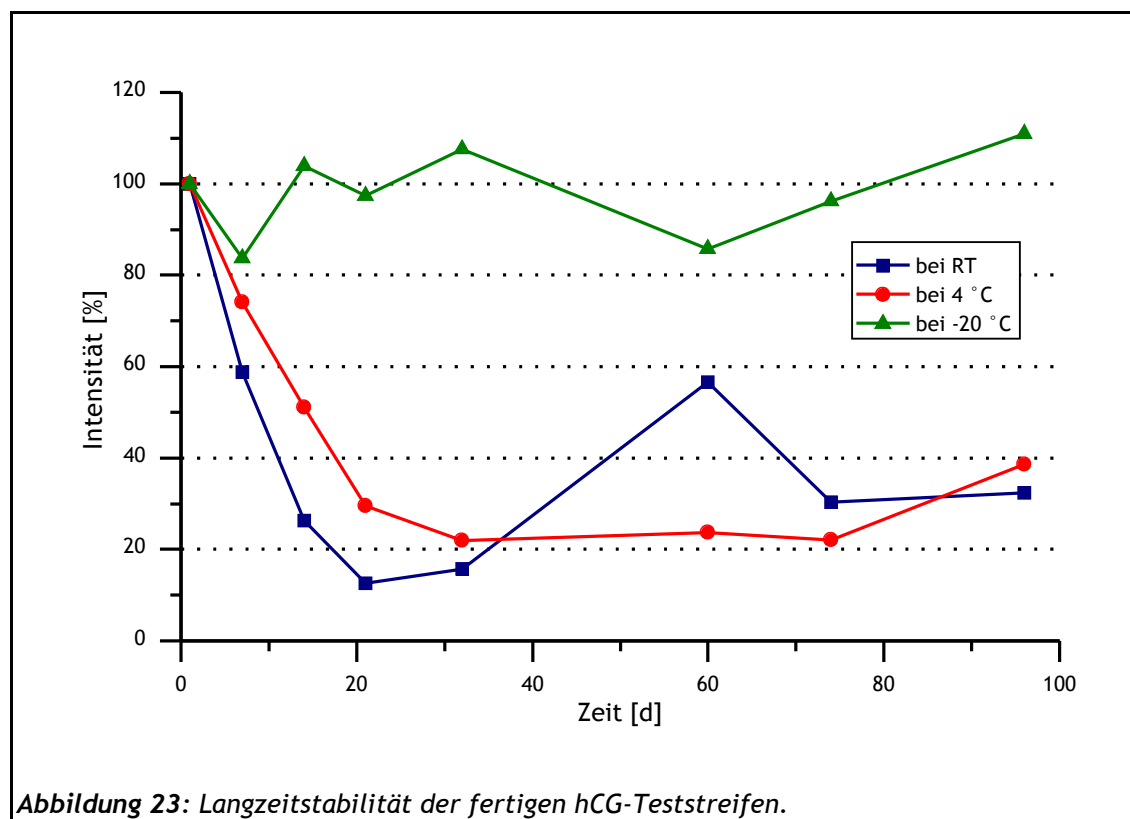


Auch die Stabilitätsuntersuchungen mit fertiggestellten Teststreifen erbringen positive Ergebnisse. Deutlich erkennbar ist der Unterschied zwischen den bei RT sowie den bei 4 °C gelagerten Streifen und den eingefrorenen Teststreifen (Abb. 23). Während die eingefrorenen Teststreifen über die gesamte Versuchsdauer von über 100 Tagen nahezu gleichbleibende Signalintensitäten lieferten, nahmen diese bei den bei RT und bei den leicht gekühlt gelagerten Teststreifen bereits innerhalb der ersten 20 Tage rapide auf 20-40% der ursprünglichen Linienintensität ab und pendelten sich auf diesem niedrigen Niveau ein. Reproduzierbare Tests sind mit unter diesen Bedingungen gelagerten Teststreifen nicht mehr möglich.

Eine Verbesserung der Langzeitstabilität bei RT lässt sich durch Lyophilisierung der fertiggestellten Teststreifen erreichen, da dem System auf diese Weise ein Großteil seiner Restfeuchtigkeit entzogen wird. Dazu wird die frisch

1.2 Optimierung der Konjugat-Qualität

hergestellte Konjugat-Suspension mit 3% (w/w) Saccharose als „Frostschutzmittel“ stabilisiert [Tippkötter, 2005]. Direkt nach der Auftragung von jeweils



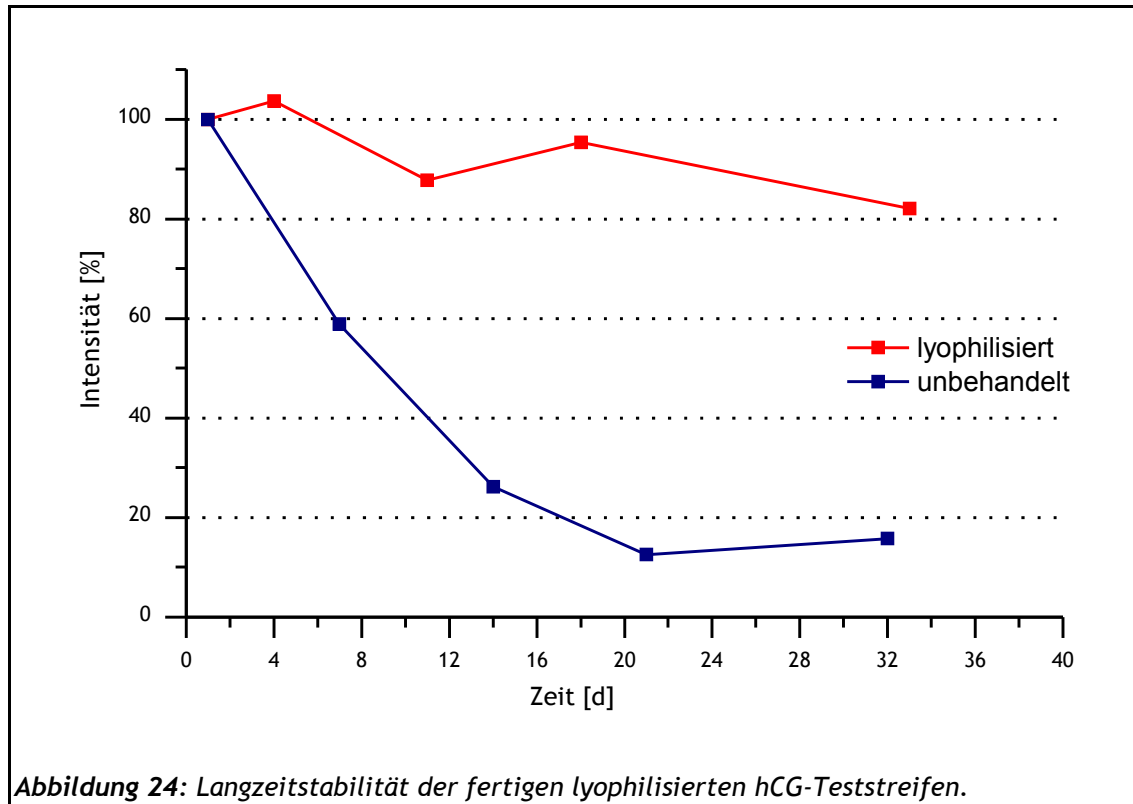
3 μL des Antikörper-Gold-Konjugates werden die Teststreifen für 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und danach für 3 h im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Teststreifen werden sofort in evakuierte Plastikbeutel eingeschweißt und unter Lichtausschluss bei RT gelagert. Die Überprüfung der Teststreifen erfolgt wie bereits beschrieben mit hCG-Proben.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen konnte die Stabilität der Teststreifen bei RT deutlich gesteigert werden (Abb. 24). Während die Intensität der unbehandelten Teststreifen bis auf 10-15% der Ausgangsintensität abnimmt, verringert sich die Signalstärke der lyophilisierten Teststreifen nach ca. 30 Tagen nur um rund 20%.

Äußere Einflüsse führten nach dem Ende der beschriebenen Versuchsreihen zu einer Verlagerung von Stabilitätsuntersuchungen auf ein anderes Testsystem. Neue Erkenntnisse wurden nicht mehr an dem hCG-Modell untersucht, sondern direkt in die Entwicklung des angestrebten MC-LR-Testsystem integriert. Die entsprechenden weitergehenden Optimierungen werden in Kap. 7.3 erläutert. An dieser Stelle sei nur darauf hingewiesen, dass durch

1.2 Optimierung der Konjugat-Qualität

Modifikationen in der Konjugatherstellung und im Konjugatauftrag sehr gute Langzeitstabilitäten mit vergleichsweise geringem Aufwand erreicht werden können.



1.3 Herstellung von Latex-Konjugaten

Bereits im Theoretischen Teil wurden die Vorzüge von Latex-Konjugaten gegenüber der Verwendung kolloider Gold-Lösungen beschrieben. Vor allem die Möglichkeit, verschiedenartige Marker (verschiedene Farben, paramagnetische Partikel, fluoreszierende Partikel) in einem Test verwenden zu können, war Motivation für die folgenden Versuche zur Herstellung von Latex-Konjugaten.

1.3.1 Passive Adsorption von Antikörpern an Latex-Partikel

Ebenfalls im Theoretischen Teil wurde erläutert, dass verschiedene Möglichkeiten bestehen, Proteine an Latex-Partikel zu koppeln. Die Kopplung kann sowohl über passive Adsorption erfolgen als auch über den Einsatz funktionalisierter Partikel und die daraus folgende kovalente Bindung der Proteine. Im Folgenden soll die passive Adsorption beschrieben werden. Für eine passive Adsorption sollte i.A. eine Inkubation von Proteinen und Latex-Partikeln bei milden Bedingungen ausreichen [Bangs, 1999a].

Die in dieser Arbeit verwendeten Partikel bestehen vollständig aus Polystyrol (PS) und sind blau eingefärbt. PS bietet gegenüber Copolymeren, die beispielsweise aus PS und Methylmethacrylat bestehen, den Vorteil, dass eine Verdrängung der zu markierenden Antikörper von der Partikeloberfläche durch andere Proteine oder Tenside in dem Adsorptionspuffer nahezu nicht stattfindet. Grund dafür ist die hohe Hydrophobizität der PS-Partikel, die eine Bindung der Antikörper bevorzugt. Außerdem könnte der hohe Anteil hydrophober Aminosäuren im Fc-Fragment der Antikörper zu einer für den Schnelltest günstigen Ausrichtung dieser Moleküle auf der Partikeloberfläche führen.

In der Literatur kommen verschiedene Puffersysteme bei der Konjugation von Antikörpern und Latex-Partikeln zum Einsatz. PBS-Puffer im physiologischen Bereich (pH 7,4; 150 mM NaCl, S. 176) haben sich als vorteilhaft für die Konjugation erwiesen. Die milden Bedingungen schonen zum einen die Antikörper, und der Zusatz von NaCl reduziert die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen IgG-belegten PS-Partikeln (PSP), was eine Aggregation der Partikel unterdrücken soll [Bangs, 1999a], [Ronner, 1984], [Bolívar, 1998].

Die optimale Antikörper-Konzentration zur Konjugation lässt sich nach einer einfachen Formel berechnen:

1.3 Herstellung von Latex-Konjugaten

$$S = \left(\frac{6}{\rho \cdot D} \right) \cdot C \quad (1)$$

S = Menge an Antikörpern zur Oberflächensättigung [mg IgG / g PSP]; ρ = Dichte der verwendeten PSP (hier: 1,05 g/cm³); D = Durchmesser der verwendeten PSP (hier: 0,18 μ m); C = Kapazität der Partikeloberfläche bzgl. Größe (8 nm) und Gewicht (155 kDa) des Proteins (hier: 2,5 mg Protein / cm² Oberfläche)

Aus den unter Gl. 1 angegebenen Vorgaben errechnet sich eine benötigte Antikörpermenge von 79,37 mg / g PSP. Der Einfachheit halber wird dieser Wert in den folgenden Versuchen auf 80 mg/g aufgerundet. Bei einem eingesetzten Probenvolumen von 200 μ L mit 50 μ L PSP-Lösung (1% (w/w) Feststoffgehalt) werden 40 μ g Antikörper für eine Konjugation benötigt. Es empfiehlt sich, bei der Konjugation die beschriebene PSP-Konzentration einzustellen, da es bei höher konzentrierten PSP-Lösungen zu einer ungleichmäßigen Adsorption der Antikörper an die Partikel kommen kann.

Die Untersuchungen zur IgG-Latex-Konjugation erfolgen anhand des bereits in Kap. 1.1 beschriebenen 2-Komponenten-Modells mit IgG_{Maus} als markiertem Mab und anti-Maus-IgG_{Ziege} als Fängerreagenz. Dazu wird mit Adsorptionspuffer III (S. 176) eine Verdünnungsreihe von IgG_{Maus}-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,5 mg/mL erstellt (bezogen auf das spätere Gesamtvolumen von 200 μ L). Zu diesen 150 μ L-Proben werden 50 μ L einer 1%igen PSP-Lösung gegeben. Bezogen auf das Gesamtvolumen ergibt sich so ein PSP-Gehalt von 0,25%. Eine Oberflächensättigung der PS-Partikel durch IgG-Moleküle sollte unter den gegebenen Bedingungen ab 0,2 mg/mL IgG erreicht werden. Die Proben werden für drei Stunden unter stetigem Schütteln (Laborschüttler, 600 rpm) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wird das entstandene Konjugat für 15 min bei 10.000 g bei RT abzentrifugiert und bis zu dreimal mit Adsorptionspuffer III gewaschen. Schwer lösliche Pellets werden in einem Ultraschallbad (wenige Sekunden zwischen den Waschschritten) resuspendiert. Das gewaschene Antikörper-PS-Konjugat wird mit Lagerungspuffer II (S. 179) (PBS; pH 7,4; 1% (w/w) BSA, 0,05% (w/w) NaN₃) auf eine Partikelkonzentration von 10 mg/mL eingestellt und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Tests mit den in Kap. 1.1 beschriebenen Teststreifen (anti-Maus-IgG_{Ziege} als Fängerreagenz) erfolgen zeitnah, um Lagerungseffekte auszuschließen.

1.3 Herstellung von Latex-Konjugaten

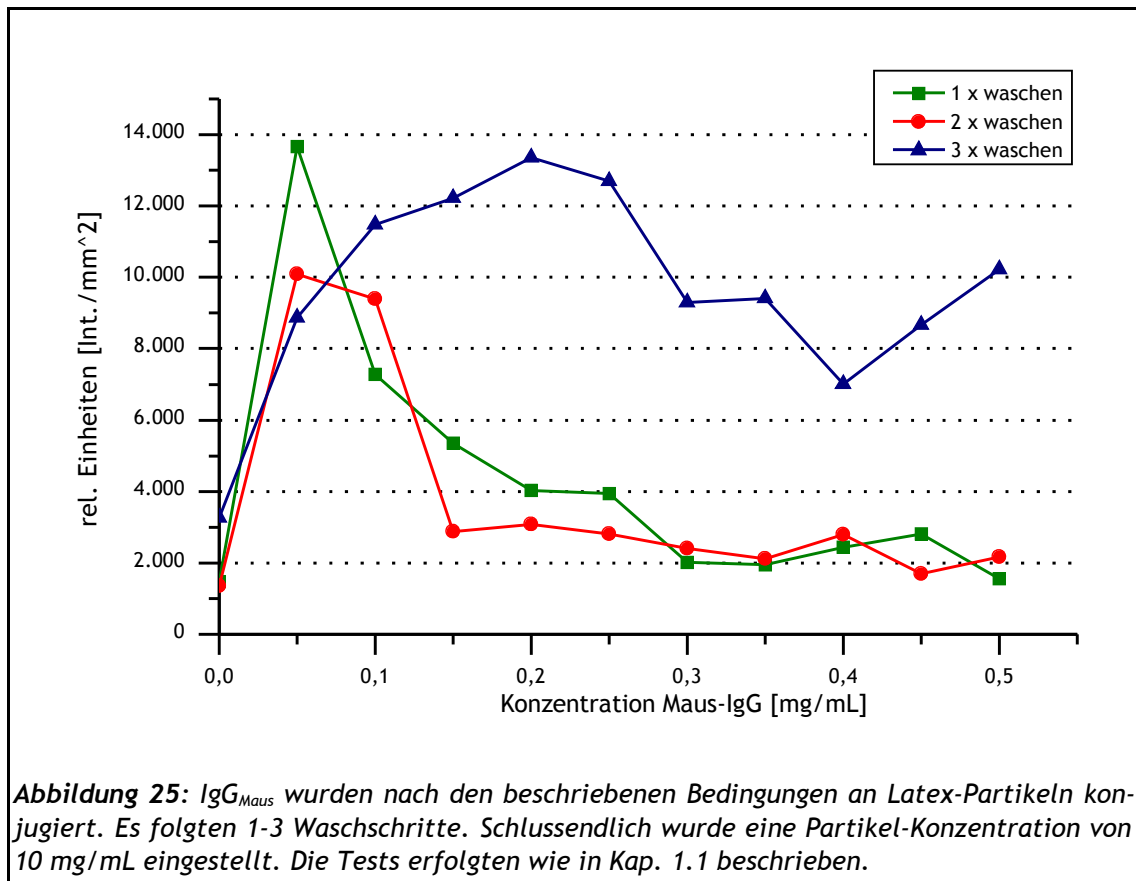


Abb. 25 zeigt den Intensitätsverlauf der Testlinie nach ein, zwei und drei Waschschrten bei verschiedenen IgG-Konzentrationen. Deutlich erkennbar ist die Zunahme der Intensität hin zu einem Maximum um 0,2 mg/mL IgG (bei drei Waschschrten). Diese Konzentration war zuvor auch rechnerisch als Optimum bestimmt worden. Ansonsten zeigt sich ein ähnliches Bild, wie es bei der Antikörper-Gold-Konjugation bereits beschrieben wurde. Zu wenige Waschschrte führen zu einer rapiden Verringerung des Testsignals bei höheren IgG-Konzentrationen, da überschüssige Antikörper nicht ausreichend aus der Konjugatlösung entfernt werden.

Im Vergleich zu den mit Antikörper-Gold-Konjugaten erreichten Intensitätswerten (vgl. Kap. 1.1) waren die mit PS-Partikeln erhaltenen Testsignale bereits in diesem Zwei-Komponenten-System schwach. Es wurden zwar noch weitere Optimierungsversuche mit unfunktionalisierten PS-Partikeln unternommen, allerdings brachten diese im Gegensatz zu den Optimierungen der Antikörper-Gold-Konjugation keine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Zuverlässigkeit der Antikörper-PSP-Konjugation bzw. der Anwendung der hergestellten Konjugate [Kroll, 2004], [Tippkötter, 2005]. Nicht zuletzt wegen

der vergleichsweise großen Mengen an Antikörper, die für diese Konjugationen eingesetzt werden mussten, wurden diese Versuche schließlich nicht weiterverfolgt.

1.4 Fazit

Wie bereits im Theoretischen Teil angedeutet und in Kap. 1.1 bis 1.3 ausgeführt, gestaltete sich unter den vorliegenden Bedingungen die Herstellung funktionsfähiger Antikörper-Gold-Konjugate deutlich einfacher und erfolgreicher als die Herstellung von Antikörper-PSP-Konjugaten. Es war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich, mittels passiver Adsorption PSP-Konjugate aus unfunktionalisierten PS-Partikeln in reproduzierbarer Qualität und ausreichender Menge herzustellen. Es wurde deutlich, dass bei einer angestrebten Verwendung von PS-Partikeln nur eine kovalente Konjugation von funktionalisierten Partikeln und Antikörpern zum Ziel führt. Um dieses Ziel zu erreichen, müsste allerdings ein, vor allem finanziell, deutlich höherer Aufwand betrieben werden.

Im Gegensatz zu den Schwierigkeiten bei der Antikörper-PSP-Konjugation konnten Antikörper-Gold-Konjugate nach den beschriebenen Optimierungsschritten zuverlässig und in gleichbleibender Qualität hergestellt werden und standen damit für einen Teil der im Folgenden beschriebenen Entwicklungsschritte zur Verfügung.

1.5 Ausblick

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Antikörper-PSP-Konjugation wäre eine Fortsetzung der Arbeiten in diesem Bereich wünschenswert. Gerade im Hinblick auf die im Theoretischen Teil beschriebenen Möglichkeiten, die Latex- bzw. Polystyrol-Partikel bieten, wäre eine erfolgreiche Konjugation dieser Partikel an Antikörper interessant. Basierend auf den bisher gesammelten Erfahrungen sollte eine Antikörper-PSP-Konjugation aber mit funktionalisierten Partikeln erfolgen.

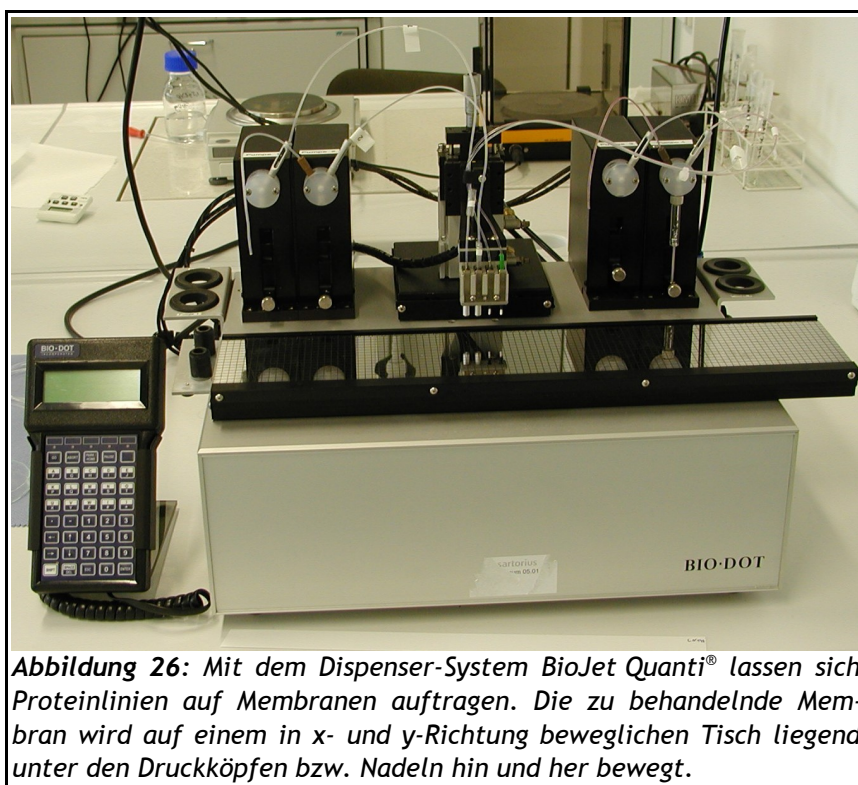
Bezüglich der Antikörper-Gold-Konjugation sind noch weitere Optimierungsmöglichkeiten denkbar, die - wie bereits angedeutet -, z.T. auch in dieser Arbeit realisiert werden.

2. Teststreifen

2.1 Vorbehandlung der Einzelkomponenten

2.1.1 Membran

Die in dieser Arbeit eingesetzten LFD-Membranen sind gebrauchsfertig erhältlich. Sie können entweder nicht-unterstützt oder unterstützt (auf einem dünnen Plastikfilm) bezogen werden. Im Allgemeinen lassen sich unterstützte Membranen besser handhaben, da sie wegen des stabilen Plastikfilms weniger fragil sind als nicht-unterstützte. Die Membranen müssen i.A. nicht vorbehandelt werden, da eine für den Testablauf notwendige Blockierung freier Membranplätze während der Testdurchführung erfolgt. Auf die Membran müssen allerdings die notwendigen Proteinlinien aufgetragen werden. Die Proteine können direkt aus entsprechenden Pufferlösungen appliziert werden.



Dazu bedient man sich eines entsprechenden Dispenser oder Printers (z.B. Biodot XYZ 3050 Dispense Workstation[®] mit BioJet Quanti[®]-Dispenser BJQ 3000; Abb. 26). Die Proteinlösungen werden in diesem Gerät mit Hilfe von Mikroliterspritzen und feinen Schrittmotoren über Schläuche in Druckköpfe mit Piezoventilen oder in feine Kapillaren gespült. Während die Lösungen über die Druckköpfe in feinsten Tröpfchen (20 nL - 2 μ L [Biodot, 2005]) kon-

2.1 Vorbehandlung der Einzelkomponenten

taktlos auf die Membran aufgesprüht werden können, ziehen die dünnen Kapillaren im Kontaktverfahren ebenfalls sehr genau dosierbare Proteinlinien auf die Membranoberfläche. Die so aufgetragene Proteinlösung sinkt in die Membranstruktur ein und das verwendete Lösemittel trocknet. Währenddessen werden die gelösten Proteine nach den beschriebenen Mechanismen an die Membran gebunden.

Die genauen Einstellungen, mit denen die Proteinlinien in der vorliegenden Arbeit aufgetragen werden, sind in Tab. 4 aufgelistet. Modifikationen dieser Standardvorschrift sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben.

Nach dem Auftrag der Proteinlinien werden etwaige Fehler im Linienauftrag mit Kugelschreiber markiert, um eine spätere Verwendung fehlerhafter Streifenbereiche zu vermeiden. Die Membranstreifen werden zunächst für ca. 30 min bei RT getrocknet und danach für weitere 30 min bei 40° C im Trockenschrank. Nach kurzem Abkühlen auf RT sind die Membranstreifen für die Testherstellung verwendbar. Die fertigen Membranstreifen können in blickdichte Folie eingeschweißt bei RT gelagert werden.

Tabelle 4: Standardeinstellungen des zum Proteinlinienauftrag verwendeten BioJet Quanti®-Dispensers BJQ 3000

Länge	250 mm
Vorschubgeschwindigkeit	50 mm/s
Tropfenvolumen	20,83 nL
Tropfenabstand	0,24 mm
Volumen/Länge	0,87 µL/cm
Öffnung Piezo-Ventil (on time)	0,2 ms

2.1.2 Conjugate Pad

Bei dem in dieser Arbeit als Conjugate Pad verwendeten Material Reemay 2040 (BBA Fiberweb, Nashville, USA) handelt es sich um ein versponnenes Polyester-Vlies. Um eine reibungslose Testdurchführung zu gewährleisten, muss dieses Vlies zunächst vorbehandelt werden. In einem Imprägnierungsschritt werden die Vliesstreifen ausgiebig in einem mit verschiedenen Hilfsreagenzien versehenen Puffer getränkt und danach getrocknet.

In der vorliegenden Arbeit wird zur Imprägnierung der Conjugate Pads standardmäßig ein Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (Imprägnierungspuffer I, 100 mmol TRIS, pH 8, S. 177) mit 0,25% (w/w) Tween 20® (T20) und 0,5% (w/w) BSA verwendet. Tween 20® dient vor allem dazu, die hydrophoben CN-Membranen benetzungsfähiger für Wasser zu machen. BSA soll vor allem freie Bindungsplätze auf der CN-Membran absättigen, um eine unspezifische Bindung des Antikörper-Gold-Konjugates an das Membranmaterial zu verhindern.

Beide Reagenzien tragen auch zu der jeweils anderen Funktion bei, wobei sich für jeden Test ein optimales Verhältnis von Detergenzien und Additiven finden lässt [Jones, 2002c], [Millipore, 1998].

Das Vlies wird zunächst in Streifen von ca. 25x280 mm geschnitten und dann in den vorbereiteten Imprägnierungspuffer I (S. 177) in Bechergläsern oder Laborschalen eingelegt. Die eingelegten Vliesstreifen werden für mindestens 3-4 h bei RT auf einem Laborschüttler (ca. 100 rpm) imprägniert. Im Allgemeinen können mit 500 mL Imprägnierungspuffer I 10 Teststreifen gleichzeitig imprägniert werden. Nach der Imprägnierung werden die Vliesstreifen auf einer glatten Oberfläche ausgebreitet für ca. 12-14 h bei RT getrocknet. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Vliesstreifen waagerecht liegen, um eine gleichmäßige Imprägnierung zu gewährleisten. Von einer senkrechten Trocknung (z.B. durch Aufhängen) ist daher unbedingt abzuraten. Nach dieser Prozedur stehen die Streifen für die weiteren Fertigungsschritte zur Verfügung.

Die unterschiedlichen Anforderungen der jeweiligen Testsysteme machen auch in der vorliegenden Arbeit bisweilen Abweichungen von dieser Standardprozedur notwendig. Sie werden in den jeweiligen Kapiteln erläutert.

2.1.3 Weitere Komponenten

Das Absorbent Pad und ein optionales Sample Pad müssen i.A. nicht vorbehandelt werden. Auch für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Tests wird keine Vorbehandlung dieser Komponenten benötigt. Lediglich die teilweise verwendeten Sample Pads mussten passend zugeschnitten werden. Eine weitere Vorbehandlung findet nicht statt und wird daher nicht beschrieben. In Kap. 7.4 werden verschiedene Materialien auf ihre Eignung als Sample Pad untersucht. Auf die Gründe dafür wird an entsprechender Stelle eingegangen.

2.2 Herstellung der Teststreifen

Wie bereits beschrieben, besteht ein funktionsfähiger Teststreifen aus mehreren Einzelkomponenten. Das Zusammenfügen der Komponenten wird im Folgenden erläutert.

2.2.1 Zusammenkleben der Membran- und Pad-Materialien

Zunächst werden die verschiedenen Membran- und Pad-Materialien zusammen gebracht.

Dazu dient eine selbstklebende Plastikkarte als Unterlage. Die verwendeten Plastikkarten GL-187 von G & L Precision Die Cutting, (250 x 75 mm) sind an ihrer klebenden Oberseite mit drei separaten Schutzstreifen versehen, die einzeln abgelöst werden können. Zunächst wird der mittlere Schutzstreifen abgelöst und der vorbereitete Membranstreifen möglichst exakt parallel zur Ober-/Unterkante der Plastikkarte aufgebracht. Die Ausrichtung des Membranstreifens dient als Bezug für die weiteren Pads. Es ist darauf zu achten, dass der Membranstreifen blasenfrei und ohne Knicke und Risse aufgeklebt wird. Bei manuellem Aufkleben sollten Einweg-Latex- oder Baumwollhandschuhe verwendet werden, um eine Verschmutzung durch Hautpartikel oder Schweiß und eine Beschädigung z.B. durch spitze Fingernägel der CN-Membran zu vermeiden. Die aufgeklebte Membran sollte entweder mit den Fingern oder mit einer entsprechenden kleinen Rolle leicht angedrückt werden.

Im zweiten Schritt wird das vorbereitete Conjugate Pad auf die Plastikkarte aufgebracht. Dazu wird der untere Schutzstreifen von der Plastikkarte abgelöst. Es ist darauf zu achten, dass das Pad die bereits aufgeklebte Membran auf der ganzen Länge um ca. 1 mm überlappt. Auch das Conjugate Pad wird mit den Fingern oder einer kleinen Rolle leicht angedrückt. Analog zum eben Beschriebenen verfährt man beim Aufkleben des Absorbent Pads. Es wird, ebenfalls ca. 1 mm überlappend, an der Oberkante der Membran angebracht.

Soll ein Sample Pad verwendet werden, muss dieses - je nach Gestaltung - ebenfalls überlappend noch unterhalb des Conjugate Pads angebracht werden.

Bei manueller Fertigung ist es nahezu unmöglich, die einzelnen Pads exakt zu positionieren. Das hat zwar keine nennenswerten Auswirkungen auf die spätere Testdurchführung, allerdings führen kleine Schwankungen beim Aufkleben der Einzelkomponenten dazu, dass die Testauswertung nicht vollstän-

dig automatisiert werden kann, da die auszuwertenden Testbereiche bei jedem Teststreifen manuell angepasst werden müssen (Kap. 4.4). Eine maschinelle Fertigung würde die vorliegenden Schwankungen mit Sicherheit verringern.

Die zusammengefügteten Testkarten werden für eine Stunde mit einem gleichmäßig verteilten Gewicht von ca. 3 kg gepresst, um den druckempfindlichen Klebstoff auf den Plastikkarten entsprechend zu aktivieren. Danach sollten alle Komponenten fest miteinander verbunden sein. Es kann an dieser Stelle zu Schwierigkeiten kommen, wenn bei der Imprägnierung der Conjugate Pads hohe Konzentrationen an Detergenzien verwendet wurden, da diese die Wirkung des verwendeten Klebstoffes verringern können.

2.2.2 Schneiden der Streifen

Bei der manuellen Herstellung der Teststreifen werden an dieser Stelle zunächst die einzelnen Teststreifen quer zur Plastikkarte geschnitten. Das erfolgt entweder mit einer manuellen Schlagschere oder mit einem eigens für diesen Zweck entwickelten Cutter. Kommerziell erhältliche Guillotinen- oder Rollen-Cutter zeichnen sich durch ihre hohe Präzision hinsichtlich des Schnittes (sehr gleichmäßige Streifenbreite, keine Beschädigung der Materialien entlang der Schnitte) und ihre enorme Arbeitsgeschwindigkeit aus. Bei der kommerziellen Herstellung von Teststreifen ist die Verwendung eines solchen Cutters unerlässlich.

Im vorliegenden Fall stand ein solcher Cutter nicht zur Verfügung, und daher werden die Streifen manuell mit einer Schlagschere geschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass die Streifenbreite möglichst wenig variiert. Die Streifen wurden auf eine Breite von ca. 5 mm geschnitten.

2.2.3 Auftragung des Konjugates

Werden die Teststreifen auf manuellem Weg hergestellt, erfolgt die Auftragung des Antikörper-Gold-Konjugates auf die bereits geschnittenen Streifen mittels einer entsprechenden Feinpipette (z.B. Eppendorff-Pipette). Dazu wird ein entsprechendes Volumen des vorbereiteten Konjugates mit der Pipette aufgenommen und die Spitze der Pipette zum Auftragen vorsichtig ohne aufzudrücken mittig im oberen Drittel des Conjugate Pads aufgesetzt. Das Konjugat verteilt sich um den Aufsetzpunkt und trocknet auf dem Conjugate Pad ein. Die Wahl des Aufsetzpunktes sorgt zum einen für eine gleichmäßige Verteilung des Konjugates in der Breite. Außerdem wird so verhindert, dass

das Konjugat vor der Testdurchführung mit der Membran in Berührung kommt, was zu einer Verblockung der Membran führen könnte. Ein zu tiefer Aufsetzpunkt könnte dazu führen, dass sich das eingetrocknete Konjugat bei der Testdurchführung in die flüssige Probe eintaucht und sich beim Resolvatisieren vollständig vom Teststreifen löst. Es stünde dann für die weitere Reaktion nicht mehr zur Verfügung.

Bei der maschinellen Fertigung von Querfließschnelltests kann die Auftragung des Konjugates mit Hilfe einer Art Airbrush-Pistole (z.B. Biodot XYZ Dispense Workstation® mit AirJet Quanti®) erfolgen. Dabei wird ein definiertes Volumen an Konjugat mit Druck fein verstäubt. Der so entstehende Konjugat-Nebel schlägt sich auf dem Conjugate-Pad-Material nieder. In diesem Fall erfolgt die Auftragung des Konjugates, bevor die Teststreifen geschnitten werden. Um eine Verteilung des Konjugat-Nebels auf der Membran zu vermeiden, sollte die Auftragung vor dem Zusammenfügen der Membran- und Pad-Komponenten erfolgen.

Die vorbereiteten Teststreifen können nach ca. 30 min Trocknungszeit für Tests verwendet werden.

3. Durchführung von Schnelltests

Sofern in den entsprechenden Kapiteln nichts anderes erwähnt wird, erfolgt die Durchführung der Schnelltests nach der hier beschriebenen Vorschrift.

Für die einzelnen Versuche werden Verdünnungsreihen der jeweiligen Toxine in verschiedenen Puffern bzw. anderen wässrigen Lösungen angesetzt. Standardmäßig werden Puffer wie KPP-Puffer I (S. 178) als Probenlösung verwendet. Dabei wird jeweils eine deutlich höher konzentrierte Stammlösung (min. 100fache Konzentration) in mehreren Schritten auf eine Konzentration im „Arbeitsbereich“ verdünnt. Die Verdünnung erfolgt mittels variabler Mikroliterpipetten und Mikroreaktionsgefäße. Vor jedem weiteren Verdünnungsschritt werden die Reaktionsgefäße mit Hilfe eines Vortexers gründlich geschüttelt und somit eine homogene Konzentration in der Lösung sichergestellt.

Die weitere Verdünnung im Bereich der „Arbeitskonzentration“ erfolgt je nach benötigtem Probenvolumen entweder auch auf die eben beschriebene Art und Weise oder direkt in den Kavitäten von 96-Loch-Mikrotiterplatten. In diesem Fall erfolgt die gründliche Durchmischung der Probenlösungen mit der jeweils verwendeten Einwegspitze der Mikroliterpipette. Bei gründlicher Durchmischung der Proben konnten in Vorversuchen zwischen den beiden beschriebenen Verdünnungsverfahren keine gravierenden Unterschiede hinsichtlich der Konzentration der Proben oder deren Homogenität festgestellt werden. Für die einzelnen Tests wird ein Probenvolumen von 200 µL verwendet. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass auf jeden Fall eine ausreichende Menge für die fehlerfreie Testdurchführung zur Verfügung steht.

Jeweils ein vorbereiteter Teststreifen (s.a. Kap. 2.2) wird einzeln in eine Kavität der Mikrotiterplatten gestellt. Da der Kontakt des Teststreifens mit der Probenlösung als Startzeit gesetzt wird, sollte das Hineinstellen der Streifen innerhalb einer Konzentrationsreihe (6-10 Proben) möglichst schnell erfolgen. Die Testdauer wird mit einem programmierbaren Digitaltimer überwacht.

Nach einer vorher festgelegten Testdauer - sofern nichts anderes angegeben ist, werden als Standardbedingungen 15 min. festgelegt - werden die Streifen aus den Kavitäten entfernt, kurz auf handelsüblichem Küchenpapier abgetropft und sofort in der Lumibox (s.a. 4.2) mit einer Digitalkamera foto-

grafiert. Diese Fotodokumentation muss schnell erfolgen, da die Streifen schnell trocknen und sich der Farbeindruck der Testlinien während des Trocknens verändert.

Nach der Bildaufnahme werden die Streifen in ihre jeweiligen Kavitäten zurückgestellt und verbleiben dort, bis das gesamte Probenvolumen aufgenommen ist und die Streifen getrocknet sind.

4. Digitale Auswertung der Testergebnisse

4.1 Grundlagen der digitalen Bildauswertung

4.1.1 RGB-Farbraum

Eine ausführliche Darstellung der Grundlagen der digitalen Bildauswertung findet sich bereits in [Stückmann, 2002]. An dieser Stelle sollen lediglich die wichtigsten Zusammenhänge erläutert werden.

Die Aufnahme digitaler Bilder erfolgt bis heute nach dem RGB-System. Dabei handelt es sich um ein Modell, in dem sich durch additive Farbmischung verschiedener Anteile/Intensitäten der Grundfarben Rot, Grün und Blau alle anderen Farbwerte mischen lassen. Die Intensitäten können nach RGB für jede der drei Farben Werte zwischen 0 (keine Intensität) und 255 (maximale Intensität) annehmen. Anschaulich lässt sich das RGB-System anhand eines Würfels im kartesischen Koordinatensystem erklären, in dem die Farben auf Punkten mit definierten x,y,z,-Koordinaten liegen. Den drei Raumachsen ist jeweils eine der Grundfarben zugeordnet. Wegen der Dreidimensionalität der Darstellung wird auch vom „RGB-Farbraum“ gesprochen [Stückmann, 2002].

4.1.2 Farbtiefe und Auflösung

Die unterschiedliche Fähigkeit digitaler Aufnahmegeräte wie Kameras oder Scanner, verschiedene Farbabstufungen abzubilden, wird durch die Farbtiefe ausgedrückt. Diese wird i.A. in Informationseinheiten (Bit pro Pixel) angegeben, die pro Bildpunkt für Farbinformationen zur Verfügung stehen. Je mehr Bits pro Pixel für die Beschreibung der Farbe dieses Punktes zur Verfügung stehen, desto mehr Farben können unterschieden werden. Bei einer Farbtiefe von 1 Bit ($2^1 = 2$ Informationen) ist lediglich die Unterscheidung von zwei Farben möglich, i.A. Schwarz und Weiß. Eine Farbtiefe von 8 Bit (2^8 Informationen) ermöglicht bereits die Unterscheidung von 256 Farben, mit 16 Bit können 65.536 Farben dargestellt werden. Der gesamte RGB-Farbraum lässt sich bei

ganzzahligen Farbabstufungen (256 pro Farbe, also $256^3 = 16,78$ Mio.) mit einer Farbtiefe von 24 Bit abbilden.

Zwar sollte die optische Auswertung mit zunehmender Differenzierung der aufgenommenen Farben auch exakter möglich sein. Allerdings ist eine sehr feine Unterscheidung von Farbdifferenzen auch mit einer enormen Zunahme der Datenmengen verbunden, was i.A. unpraktikabel ist. In der vorliegenden Arbeit wird bei der Aufnahme der auszuwertenden Bilder ein Kompromiss zwischen der Farbtiefe und einer handhabbaren Datenmenge angestrebt. Eine Auswertung farbiger Bilder führt außerdem zu weiteren Schwierigkeiten, da die Farbkanäle mit der verwendeten Software einzeln ausgewertet werden müssten. Die aufgenommenen Bilder werden daher auf Graustufen (0 - 255) reduziert.

Neben der Farbtiefe ist auch die Auflösung der Aufnahmeeinheit eine wichtige Größe für die computerunterstützte Bildauswertung. Die Auflösung einer Kamera oder eines Scanners gibt an, wie groß die Fläche auf der Vorlage ist, deren Farbinformationen in einem Pixel zusammengefasst werden. Je mehr Pixel auf die gleiche Fläche kommen, desto höher ist die Auflösung und desto detailgetreuer werden Feinstrukturen der Vorlage in dem aufgenommenen Bild wiedergegeben. Bei Digitalkameras müssen bei der Bestimmung der Auflösung individuelle Einstellungen wie der Zoomfaktor berücksichtigt werden. Die Ermittlung der Auflösung kann in diesem Fall nur anhand einer Längenkali-
bration von aufgenommenen Strukturen erfolgen [Stückmann, 2002].

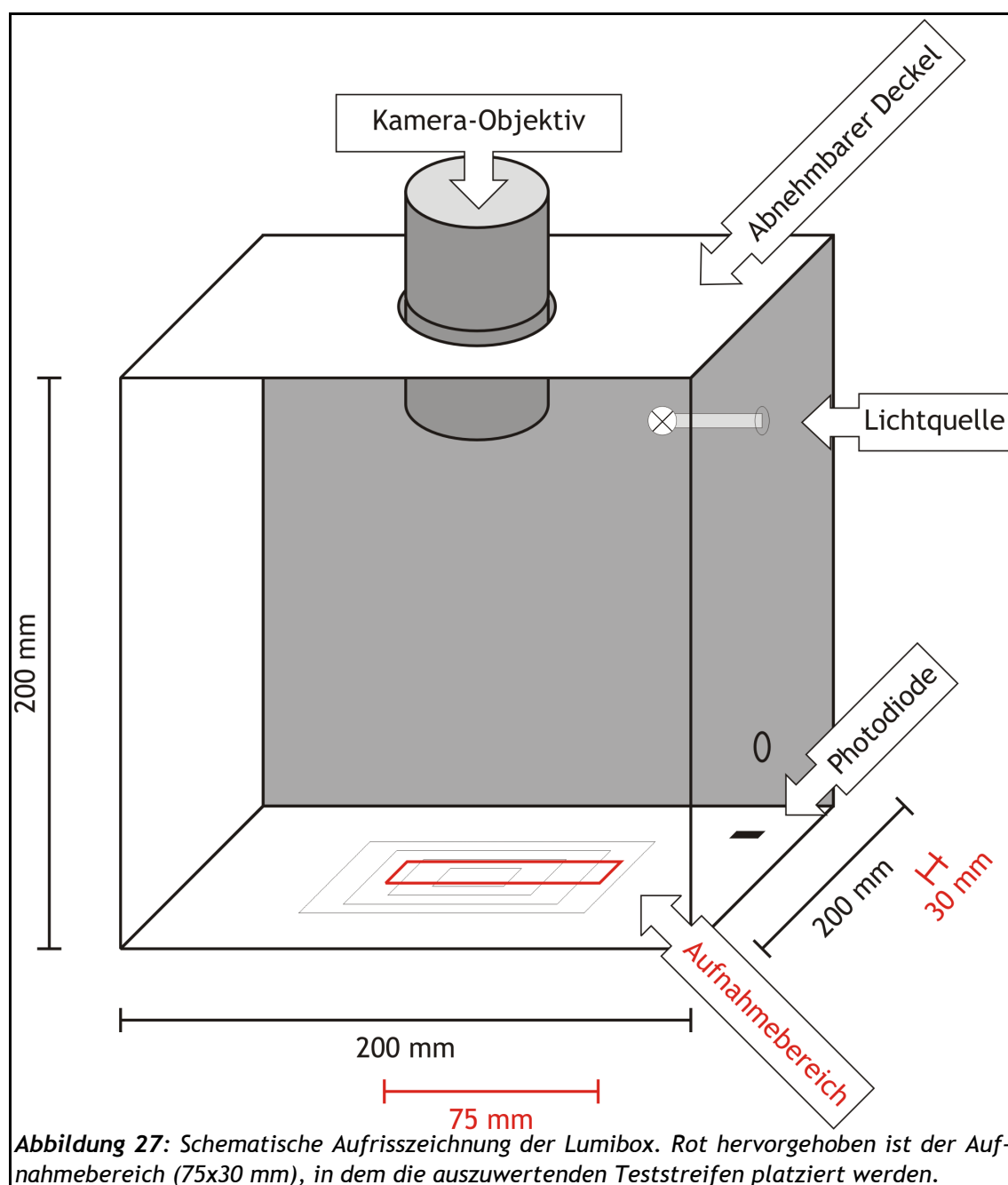
4.2 Entwicklung der „Lumibox“

In [Stückmann, 2002] wurden die Auswirkungen der ungleichmäßigen Beleuchtung eines aufgenommenen Digitalfotos auf die Testauswertung beschrieben. Um verlässliche Daten zu erhalten, mussten die Ungleichmäßigkeiten durch ein „Null-Bild“ aus dem auszuwertenden Digitalfoto herausgerechnet werden. Es wurde festgestellt, dass die verwendete Beleuchtungskammer die Ursache für die ungleichmäßige Beleuchtung war.

Um die beobachtete Fehlbeleuchtung der zu fotografierenden Proben und die daraus resultierenden Ausgleichsschritte zu vermeiden, wird für die vorliegende Arbeit und die damit zusammenhängenden Master- und Diplomarbeiten [Kroll, 2004], [Tippkötter, 2005] und [Wawra, 2005] eine eigene Beleuchtungskammer entwickelt, im Folgenden als „Lumibox“ bezeichnet.

Die „Lumibox I“ (Abb. 27) besteht aus einem Gehäuse mit einem Innenmaß

4.2 Entwicklung der „Lumibox“



von 200 x 200 x 200 mm (B x H x T). Die Maße wurden an die Eigenschaften der verwendeten Digitalkamera angepasst (s.a. Kap. 4.3). Die Innenseiten des aus Holzplatten gefertigten Gehäuses werden mit schwarzer Sprühfarbe eingefärbt, um Reflexionen der verwendeten Lichtquelle zu vermeiden. Mittig in den abnehmbaren Deckel der Lumibox wird ein Loch gesägt (Durchmesser 55 mm), um an dieser Stelle das Objektiv der verwendeten Digitalkamera (s.a. Kap. 4.3) einführen zu können. Als Lichtquelle wird eine Halogenlampe der Firma Osram (Halostar Standard®, 12 Volt, 10 Watt) verwendet, die in ei-

nem entsprechenden Sockel 160 mm über dem Boden der Beleuchtungskammer installiert wird. Die Lampe wurde zunächst mit Hilfe eines nicht-regelbaren Netzteils für Wechselspannung mit Spannung versorgt.

Nachdem festgestellt worden war, dass sich die Helligkeit der verwendeten Leuchtmittel trotz gleicher Spezifikationen erheblich unterscheidet und dieser Unterschied einen erkennbaren Einfluss auf die Auswertung der fotografierten Teststreifen hat, wurde am Boden der Lumibox ein Photowiderstand installiert, dessen Widerstand mit Hilfe eines digitalen Multimeters gemessen wird. Der gemessene Widerstand wird als Maß für die Lichtintensität verwendet. Das nicht-regelbare Netzteil wurde gegen ein regelbares Netzteil für Gleichspannung ausgetauscht, und mit Hilfe der Spannungsregelung kann bei der „Lumibox II“ die Beleuchtungsstärke im Inneren der Kammer konstant gehalten werden.

Um die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen früherer Versuche zu gewährleisten, wird als Richtwert für die weiteren Versuche mit der Lumibox II der mit der Lumibox I (nicht-regelbares Netzteil) gemessene Wert zu Grunde gelegt.

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgen sämtliche Aufnahmen der Versuchsergebnisse in der Lumibox II.

4.3 Bildaufnahme

Die Aufnahme der Digitalbilder erfolgt mit der handelsüblichen Digitalkamera DiMAGE 7i[®] der Firma Minolta (Abb. 28). Neben der üblichen Programmautomatik, über die die meisten elektronischen und halbelektronischen Kameras verfügen, hat diese Kamera den Vorteil, dass sie vielfältige Einstellungsmöglichkeiten bietet, mit denen u.a. die Belichtungszeit, die Blende, die Lichtempfindlichkeit, der Weißabgleich oder die Fokussierung manuell reguliert werden können. Es ist demzufolge möglich, die Aufnahmeeinstellungen über mehrere Bilderserien konstant zu halten und die eingestellten Werte eindeutig zu dokumentieren.



Nach einigen Vorversuchen mit der Lumibox wurde festgestellt, dass eine möglichst kleine Blende (3,5), eine geringe Lichtempfindlichkeit (ISO 100) und

ein Weißabgleich für Kunstlicht am Besten für die Bildaufnahmen geeignet sind. Die Bilder werden bei der vollen Zoomeinstellung von 50,8 mm (entspricht 200 mm im 35 mm-Kleinbildformat) im Makro-Modus aufgenommen.

Da mit zunehmender Lichtempfindlichkeit (ISO 100 - ISO 800) auch das Bildrauschen im aufgenommenen Foto zunimmt [Minolta, 2002], wird hier die kleinstmögliche Einstellung gewählt.

Die Blendenöffnung wiederum hat nicht nur Einfluss auf die notwendige Belichtungszeit (je kleiner, desto kürzer), sondern auch auf die Schärfentiefe (je kleiner, desto kleiner) [Minolta, 2002]. Da für die geplanten Aufnahmen keine große Schärfentiefe notwendig ist, sondern - um eine Überbelichtung der Aufnahmen und Unschärfen durch „Verwackeln“ zu verhindern - eher eine möglichst kurze Belichtungszeit, wird die kleinstmögliche Blende gewählt. Mit Belichtungszeiten zwischen 1/90- 1/250 s konnten ausreichend helle Bilder aufgenommen werden. Die unterschiedlichen Belichtungszeiten werden gewählt, um verschiedene auftretende Effekte auf den Teststreifen bei Bedarf deutlicher hervorheben zu können.

Die Fokussierung der Bilder wird zunächst auch manuell vorgenommen. Es wird allerdings festgestellt, dass eine automatische Fokussierung keinen Einfluss auf die Bildaufnahme hat. Daher werden im weiteren Verlauf der Arbeit die Bilder automatisch fokussiert.

Die Bilder werden mit der vollen Auflösung (5 Mio. Pixel) im weitgehend verlustfreien JPEG-Bildformat abgespeichert. Die genauen Einstellungen sind Tab. 5 zu entnehmen. Weitere Informationen zur Funktionsweise der Kamera finden sich in der Literatur [Minolta, 2002].

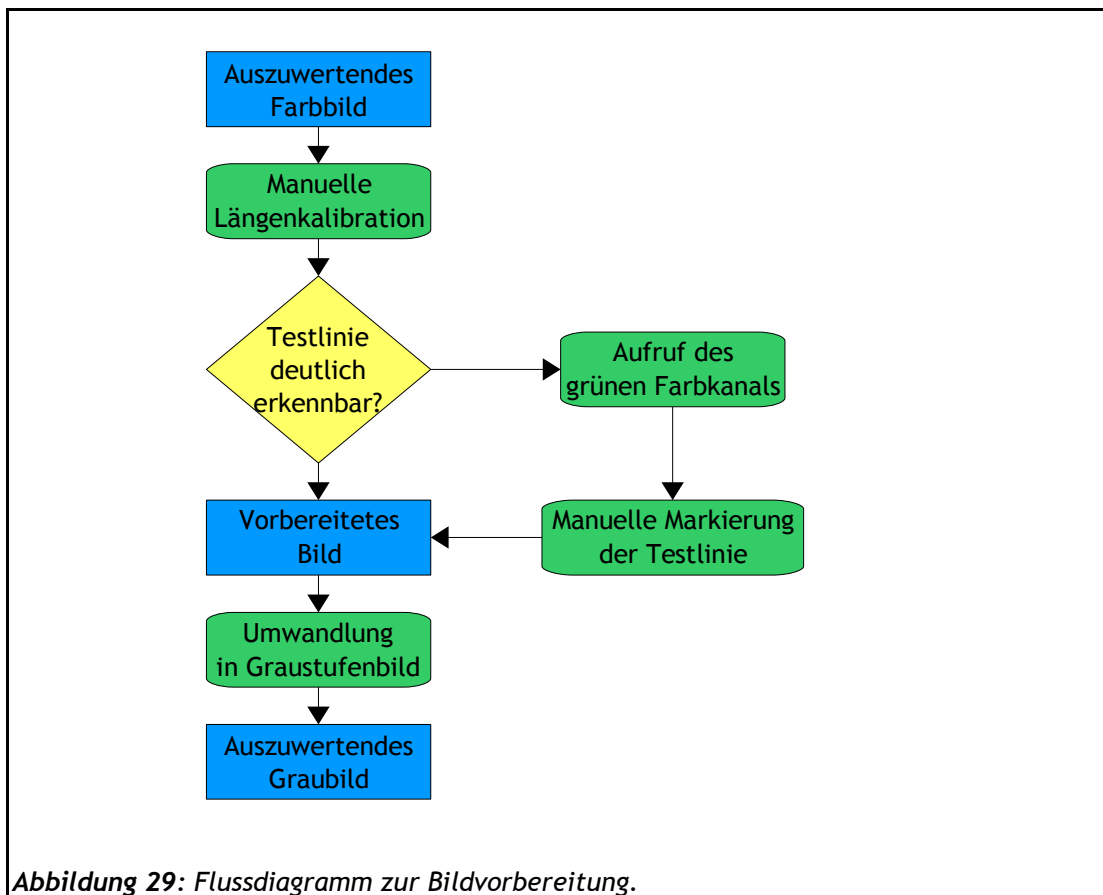
Tabelle 5: Kameraeinstellungen für die Aufnahme von Digitalbildern

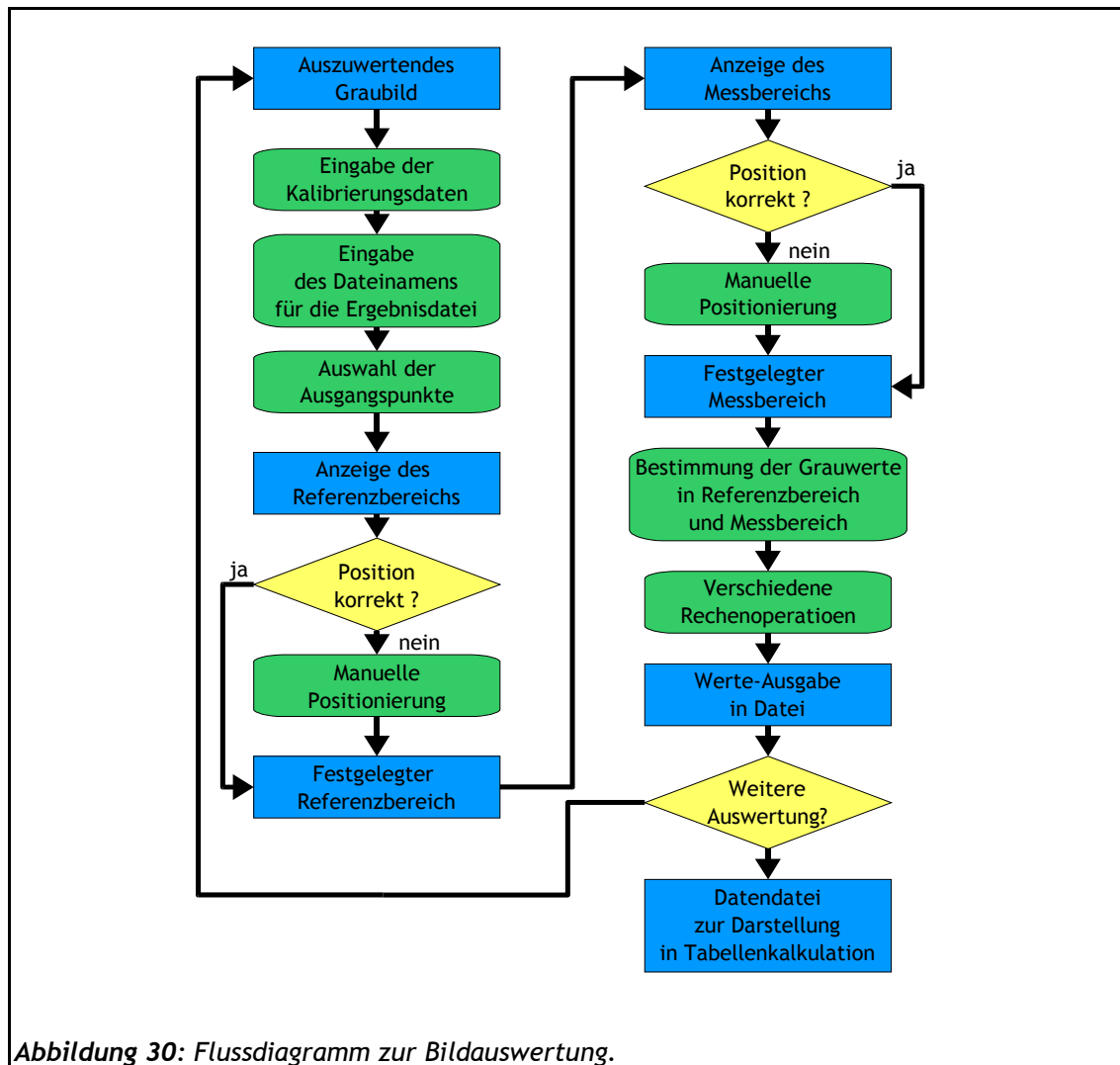
<i>Einstellung</i>	<i>Wert</i>
Blende	3,5
Lichtempfindlichkeit	ISO 100
Zoom	50,8 mm (200 mm KB-Format)
Weißabgleich	Kunstlicht
Makro	ein
Fokussierung	automatisch
Belichtungszeit	1/90 - 1/250 s
Bilddimensionen	2560 x 1920
Auflösung	5 Mio. Pixel
Bildformat	JPEG, höchste Qualität

4.4 Bildauswertung mit Optimas 6.5

Eine ausführliche Beschreibung der digitalen Bildauswertung mit Optimas 6.5 finden sich bereits in [Stückmann, 2002] und [Klewitz, 2004]. Die in diesen Arbeiten verwendeten Auswertungsroutinen wurden hinsichtlich der Benutzerfreundlichkeit und Auswertungsgeschwindigkeit deutlich optimiert und auf die Erfordernisse der vorliegenden Arbeit angepasst. Die Flussdiagramme Abb. 29 und Abb. 30 geben Aufschluss über den Gang der Auswertung. Die verwendeten Makros für Optimas 6.5 finden sich im Anhang (VI, Kap. 2).

Auch bei den digitalen Auswertungen, die den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde liegen, konnte auf eine visuelle Komponente nicht verzichtet werden. Zwar erfolgte die Auswertung der Teststreifen weitgehend automatisiert. Die Kalibrierung der Auswertungsroutinen auf die jeweiligen Bilder (Längeneinheiten) sowie die Anpassung der Auswertungsbereiche musste jedoch manuell erfolgen. Grund hierfür waren unvermeidbare Schwankungen bei der Herstellung der Teststreifen, die bereits in Kap. 2.2 erläutert wurden.





5. Statistische Versuchsplanung mit dem Simplex-Algorithmus

5.1 Allgemeine Bemerkungen zur statistischen Versuchsplanung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Optimierung der zu entwickelnden Testsysteme untersucht, ob dieses Ziel mit Hilfe statistischer Versuchsplanung erreicht werden könnte. Im Folgenden soll daher ein knapper Überblick über dieses Themengebiet gegeben werden.

Die Entwicklung neuer Prozesse und Produkte beruht oft auf Ergebnissen aus der statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments = DoE). Meistens hat eine Vielzahl von Faktoren einen Einfluss auf die endgültige Beschaffenheit z.B. eines Produktes. Oft - beispielsweise bei der Entwicklung chemischer Prozesse oder von vielerlei Produkten, die aus mehreren Komponenten bestehen - ist es nicht möglich, all diese Einflussfaktoren einzeln bzw. ihre Wechselwirkungen aufeinander genau zu untersuchen. Das kann sowohl darauf beruhen, dass die Wechselwirkungen nicht bekannt sind, ebenso häufig aber auch auf Zeitmangel oder Ressourcenknappheit. In einem solchen Fall kann man sich statistischer Verfahren bedienen, um mit möglichst geringem Aufwand ein optimales Produkt oder einen optimalen Prozess zu gestalten.

Zu diesem Zweck können sogenannte Versuchspläne erstellt werden, die verschiedene Daten berücksichtigen. So spielen die Anzahl und Art der zu untersuchenden Faktoren eine Rolle und ebenso bestehende Informationen und die gewünschte Genauigkeit bzw. Zuverlässigkeit der zu ermittelnden Aussagen. Die Versuchspläne enthalten dann i.A. eine stark reduzierte Anzahl an Versuchen, nach deren Auswertung man ein mathematisches Modell erhält, aus dem man verschiedene Wechselwirkungen (Haupt- und Nebeneffekte) auf das Ergebnis ablesen kann [Mennicke, 2006], [Kleppmann, 2006].

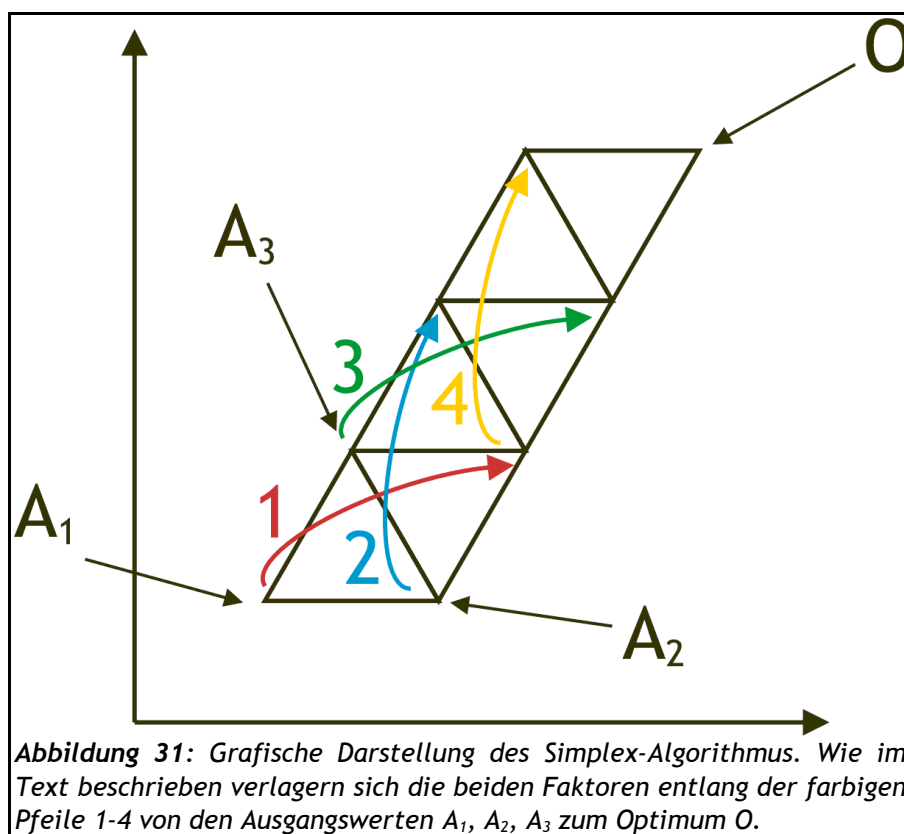
5.2 Der Simplex-Algorithmus

Auch der Simplex-Algorithmus ist ein Verfahren zur mathematischen Optimierung. Er erlaubt die exakte Lösung eines linearen Optimierungsproblems nach endlich vielen Schritten oder stellt die Unlösbarkeit des Problems fest [Casti, 1996].

Die Funktion des Simplex-Algorithmus lässt sich am anschaulichsten grafisch erläutern (Abb. 31). Angenommen wird im Beispiel ein Optimierungsproblem

mit $n=2$ Faktoren. Dabei soll eine zu bestimmende Messgröße M maximiert werden.

Es werden zunächst $n+1=3$ Versuche durchgeführt (Abb. 31, A_1 , A_2 , A_3), in denen die n Faktoren beliebig variiert werden. Die Ergebnisse dieser Versuche werden hinsichtlich M untersucht. Der Versuch mit dem niedrigsten M wird nun an der Verbindungslinie der anderen beiden Werte gespiegelt (Abb. 31, roter Pfeil 1), und es werden beim nächsten Versuch die entsprechenden Werte für die beiden Faktoren eingestellt. Der ermittelte M -Wert dieses neuen Versuches wird mit den bereits erhaltenen M verglichen, und es wird erneut der Punkt mit dem niedrigsten M an der Verbindungslinie der anderen beiden Punkte gespiegelt (Abb. 31, blauer Pfeil 2). Nach und nach nähert sich das Dreieck aus Messwerten dem optimalen Verhältnis der beiden Faktoren (Abb. 31, O) bis es diesen exakt erreicht oder um ihn „kreist“. An dieser Stelle bricht der Algorithmus ab.



Der Simplex-Algorithmus ist ohne weiteres auch auf $n>2$ Faktoren anwendbar, allerdings lässt sich dann eine Lösung nur noch rechnerisch erreichen.

Neben diesem einfachen Simplex-Algorithmus kann zur Annäherung an das gesuchte Optimum auch ein variabler Simplex-Algorithmus verwendet wer-

den. In diesem Verfahren wird der schlechteste Messpunkt gegenüber den anderen Punkten gewichtet und die beschriebene Spiegelung entweder gestreckt oder gestaucht. Mit dem variablen Simplex-Algorithmus lassen sich i.A. bessere Optimierungen erzielen.

5.3 Anwendung des Simplex-Algorithmus bei der Entwicklung immunchemischer Schnelltests

Bei der Entwicklung der Schnelltests sollten verschiedene Faktoren in Bezug auf ihre Wirkung auf die Testsensitivität verglichen werden. Dazu wurden die ermittelten Testwerte in ein Simplex-Tableau eingetragen und mit Hilfe des eigens entwickelten Programms Simplex 1.8 von David Geissler ausgewertet. Bei der Optimierung wurde ein variabler Simplex-Algorithmus nach Nelder und Mead verwendet. In dem Programm lassen sich in eine Tabelle variable Größen und Messwerte eintragen (Abb. 32). Je nach Wunsch des Nutzers schlägt das Programm nach Eingabe der Daten der Ausgangsversuche andere Versuchsbedingungen vor, mit denen der gewünschte Messwert minimiert oder maximiert werden kann. Auf weitere Details wird an entsprechender Stelle eingegangen (Kap. 6 und Kap. 7).

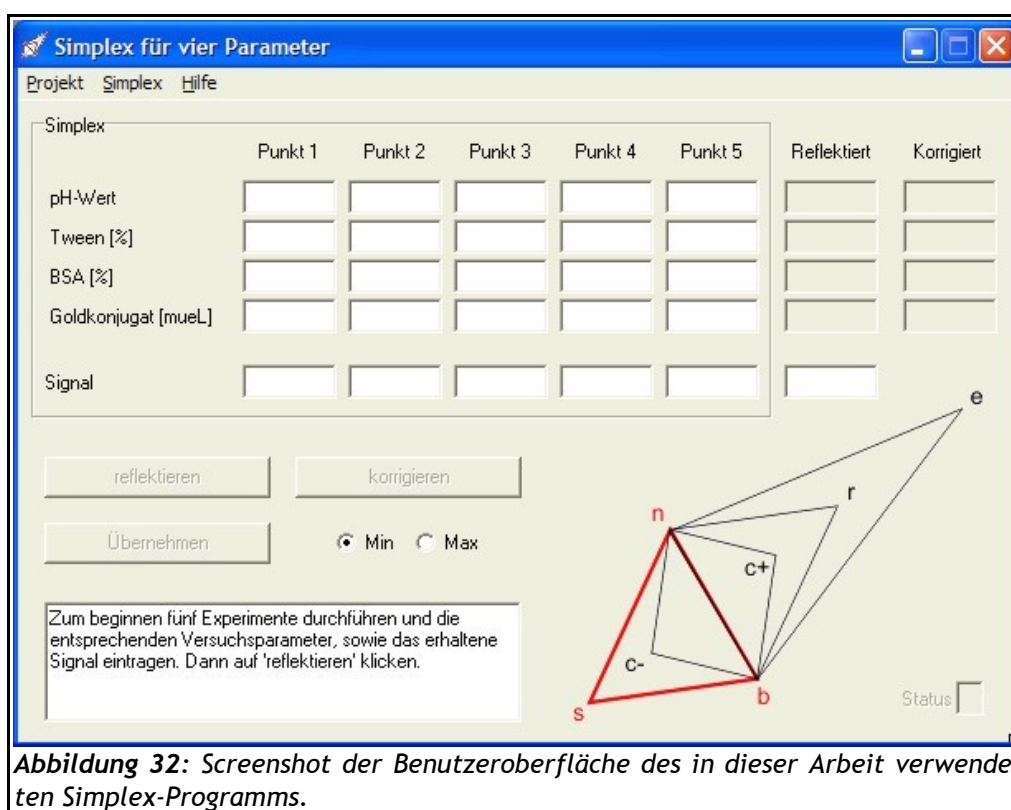


Abbildung 32: Screenshot der Benutzeroberfläche des in dieser Arbeit verwendeten Simplex-Programms.

6. Schnelltest für *Staphylococcus* Enterotoxin B

Durch eine eingehende Recherche konnten verschiedene Hersteller für polyklonale und monoklonale SEB-Antikörper ermittelt werden. Kommerziell erhältlich waren polyklonale anti-SEB aus verschiedenen Spezies (Schaf, Kaninchen) (Toxin Technology, Inc., Florida, USA) und monoklonale SEB-Antikörper aus Mäusen (Novus Biologicals, Colorado, USA; Abcam, USA: Antikörper ca. 330€/100 µg. Anogen, Ontario, Kanada: ca. 250 €/500 µg). Laut Literatur waren die PAb in einem ELISA-Test bereits erfolgreich eingesetzt worden. Auf die Beschaffung der möglicherweise besser geeigneten MAb wurde aus Kostengründen zunächst verzichtet. Das zu untersuchende Antigen SEB wurde von Sigma-Aldrich bezogen (S4881).

Bereits in früheren Projekten gesammelte Erfahrungen hatten gezeigt, dass IgG_{Kaninchen}-Gold-Konjugate durch die hohe Reaktivität des IgG_{Kaninchen} Probleme bei der Durchführung von LFDs bereiten (unspezifische Bindungen des Konjugates an die CN-Membran etc.). Es sollen daher lediglich die vorliegenden anti-SEB_{Schaf}-Antikörper SLBI 202 Gold-konjugiert werden.

Da mit der Entwicklung des SEB-Schnelltests bereits vor der Etablierung eines funktionierenden Protokolls für die Konjugat-Herstellung begonnen werden soll, erfolgen die ersten Versuche mit einem außer Haus hergestellten Konjugat (Alchemy Ltd.). Das erhaltene Konjugat hat eine optische Dichte von 9,04 bei 530 nm. Dieser Wert entspricht etwa einer Konzentration von 30 µg/mL. Zur Konjugation wurde ein Borat-Puffer mit unbekannter Molarität bei pH 9 verwendet [Alchemy, 2003].

Da es sich bei den erworbenen Antikörpern um PAb handelt, soll auch untersucht werden, ob der anti-SEB_{Schaf} sowohl als markierter Antikörper als auch als Fängerantikörper verwendet werden kann. Da in polyklonalen Antiseren keine eindeutige Spezifität der Antikörper hinsichtlich bestimmter Epitope besteht, ist diese Möglichkeit durchaus denkbar.

Als Kontrollantikörper auf dem Teststreifen soll ein anti-Schaf-IgG_{Esel} (S2763, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) eingesetzt werden.

Für die folgenden Versuche stehen also zwei Antikörpersysteme zur Verfügung:

- I. anti-SEB_{Schaf}-Konjugat, anti-SEB_{Schaf}-Testlinie, anti-Schaf-IgG_{Esel}-Kontrolllinie
- II. anti-SEB_{Schaf}-Konjugat, anti-SEB_{Kaninchen}-Testlinie, anti-Schaf-IgG_{Esel}-Kontrolllinie

6.1 Vorversuche

6.1.1 Funktionsfähigkeit der immunchemischen Testkomponenten

Um die Funktionsfähigkeit des Konjugates und der Antikörper zu überprüfen, werden zunächst Tropftests auf Membranproben gemacht.

Dazu werden jeweils 50 µL einer anti-SEB_{Schaf}-Lösung bzw. einer anti-SEB_{Kaninchen}-Lösung auf 13 mm-Stanzlinge handelsüblicher Diagnostikmembranen (Sartorius Unisart CN 140) getropft. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT und einer anschließenden Trocknung über 30 min bei 40 °C werden die Proben einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II (50 mmol, pH 6,9, S. 178) gewaschen, um ungebundene Antikörper abzuwaschen. Die noch feuchten Stanzlinge werden für 2 h mit einer BSA-Lösung (10 mg/mL in KPP-Puffer II) bedeckt, um freie Bindungsplätze auf der CN-Membran abzusättigen. Nach einem Trocknungsschritt (30 min, 40 °C) werden die Stanzlinge erneut einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II gewaschen.

Das SEB wird in KPP-Puffer III (S. 178) gelöst und mit diesem Puffer auf eine Konzentration von 10 µg/mL verdünnt. 50 µL dieser Toxinlösung werden auf jeweils einen vorbereiteten Stanzling mit immobilisiertem anti-SEB_{Schaf} bzw. anti-SEB_{Kaninchen} aufgetragen. Jeweils ein Stanzling bleibt als Negativ-Probe unbehandelt. Die so behandelten Stanzlinge werden erneut für 2 h bei RT inkubiert und danach einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II gewaschen.

Alle Stanzlinge werden nun mit 50 µL einer Antikörper-Gold-Konjugat-Suspension (5 µL Konjugat mit KPP-Puffer II verdünnt) überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Danach folgen erneut drei Waschschriffe mit je 3 mL KPP-Puffer II.

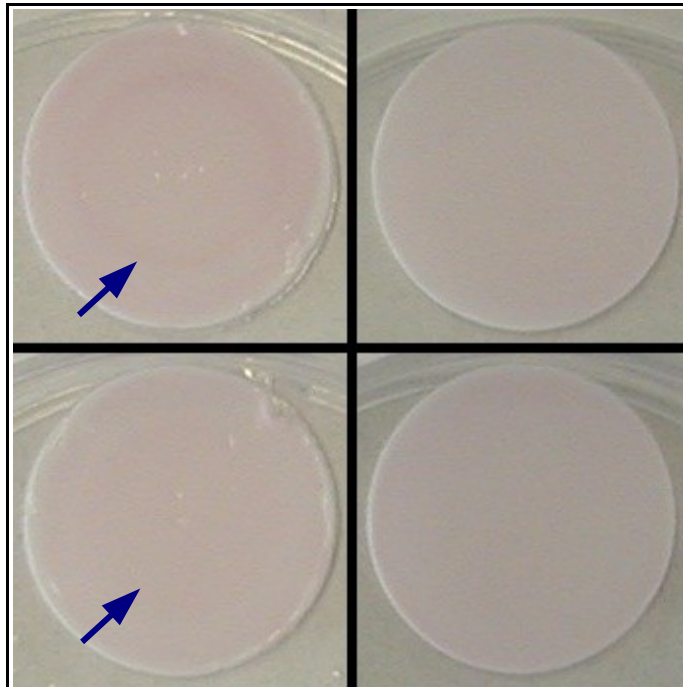


Abbildung 33: Aufnahmen der Tropfproben. Bei den positiven Proben (links) ist eine ganz leichte Ringbildung zu erkennen, die bei den Negativ-Proben (rechts) nicht auftritt. Der Ring ist bei der Probe mit anti-SEB_{Kaninchen} (oben) intensiver als bei der Probe mit SEB_{Schaf} (unten). Der Abdruck gibt den visuellen Eindruck nur unzureichend wieder. Zur Verdeutlichung ist der jeweilige Ring mit einem Pfeil markiert.

Nach den Waschschritten kann per Augenschein festgestellt werden, dass alle Membranproben eine blassrote Färbung aufweisen (Abb. 33), die auf nicht ausgewaschenes Antikörper-Gold-Konjugat zurückzuführen ist. Die toxinhaltigen Proben zeigten darüber hinaus dunklere Ringe, die auf eine stattgefundene immunochemische Reaktion hinweisen (Tab. 6). Durch die „Sandwich“-Reaktion wird das Antikörper-Gold-Konjugat rund um die Auftropfstelle zurückgehalten. Bei der Probe mit anti-SEB_{Kaninchen} fällt der Ring intensiver aus.

Tabelle 6: Ergebnisse des Inkubationsversuchs.

Fänger-antikörper	Toxin	Ring vorhanden?	Ringfärbung	Ringdurchmesser
anti-SEB _{Kaninchen}	ja	ja	deutlich	10 - 12 mm
anti-SEB _{Kaninchen}	nein	nein	nein	0 mm
anti-SEB _{Schaf}	ja	ja	leicht	8 - 9 mm
anti-SEB _{Schaf}	nein	nein	nein	0 mm

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass die immunchemischen Einzelkomponenten zumindest unter den gewählten Bedingungen einwandfrei funktionieren. Es kann folglich mit der Entwicklung eines Schnelltestsystems begonnen werden.

6.2 Versuche mit polyklonalen Antikörpern

6.2.1 Versuche mit Standardmaterialien für Schnelltestsysteme

Die Kombinationen I. (anti-SEB_{Schaf}-Konjugat, anti-SEB_{Schaf}-Testlinie, anti-Schaf-IgG_{Esel}-Kontrolllinie) und II. (anti-SEB_{Schaf}-Konjugat, anti-SEB_{Kaninchen}-Testlinie, anti-Schaf-IgG_{Esel}-Kontrolllinie) sollen mit verschiedenen Standard-Membranmaterialien (MDI 90CNPH, CNPC-SS12; Sartorius Unisart CN 140, Unisart CN 200) untersucht werden.

Dazu werden die Membranstreifen entsprechend Kap. 2 mit zwei verschiedenen Antikörper-Lösungen belegt. Als Kontrolllinie wird eine anti-Schaf-IgG_{Esel}-Lösung (1 mg/mL S2763 in 135 mmol NaCl-Lösung), aufgetragen, als Reagenz für die Testlinie wird zum einen eine anti-SEB_{Schaf}-Lösung (1 mg/mL SL-BI202 in entionisiertem Wasser) und zum anderen eine anti-SEB_{Kaninchen}-Lösung (1 mg/mL LBI202 in entionisiertem Wasser) verwendet. Die Conjugate Pads werden nach der Standard-Vorschrift vorbereitet, und es werden 3,6 µL anti-SEB_{Schaf}-Konjugat aufgetragen. Die Testdurchführung erfolgte wie in Kap. 3 beschrieben. Als Proben wurden SEB-Lösungen in KPP-Puffer III (S. 178) in einem Konzentrationsbereich von 0,1 ng/mL bis 10 µg/mL verwendet.

In dieser Versuchsreihe zeigt sich bei allen durchgeführten Tests nach 15 min kein einheitliches, der Verdünnungsreihe entsprechendes Testergebnis. Selbst die Kontrolllinie verfärbt sich kaum. Das beste Ergebnis wird zunächst mit der Unisart CN 200 erhalten. Dennoch ergeben sich innerhalb der Verdünnungsreihe mit beiden Antikörper-Kombinationen lediglich unspezifische, sehr schwache Signale auf den Testlinien. Die Kontrolllinien fallen bei Kombination I sehr schwach aus, bei Kombination II sind sie sehr viel deutlicher. Zusätzlich durchgeführte Blindtests führen lediglich mit dem Membrantyp Unisart CN 200 bei Kombination II zu deutlich erkennbaren Kontrolllinien. Eine Wiederholung der Versuche bringt nahezu dieselben uneinheitlichen Ergebnisse. Auf eine digitale Auswertung der Teststreifen wird verzichtet. Die Ergebnisse werden visuell erfasst und sind in Tab. 7 dargestellt.

6.2 Versuche mit polyklonalen Antikörpern

Tabelle 7: In der Tabelle sind die Linienintensitäten mit verschiedenen Antikörpern auf verschiedenen Membranen zusammengestellt. Dabei ist deutlich das unheitliche Bild innerhalb der Konzentrationsreihen erkennbar. Zeichenerklärung: ganz schwacher Schatten (=); Linie schwach erkennbar (-), Linie erkennbar (+), Linie sehr gut erkennbar (++); die Testlinie ist unten eingetragen, die Kontrolllinie oben.

Membran	Antikörper	Konzentrationsreihe [ng/mL]					
		10.000	1000	100	10	1	0,1
CN 140	I.						
CN 140	II.						
CN 200	I.						
CN 200	II.						
90CNPH	I.						
90CNPH	II.						
CNPC-SS12	I.						
CNPC-SS12	II.						

Die unbefriedigenden Ergebnisse aus den ersten Versuchen mit dem Testsystem lassen auf verschiedene Fehlerquellen schließen.

1. Das Toxin ist inaktiv bzw. ist durch falsche Anwendung/Lagerung inaktiviert worden.
2. Die Proteinlinien werden zu schlecht mit der Probenlösung benetzt.
3. Die in Linienform immobilisierten Antikörper werden durch die Probenlösung ausgewaschen.
4. Die Membran wird durch das im Conjugate Pad vorliegende BSA nicht ausreichend blockiert, sodass das SEB unspezifisch an die Membran gebunden wird und nicht mehr für eine Reaktion mit dem Antikörper-Gold-Konjugat zur Verfügung steht.
5. Die immunchemische Reaktion zwischen Konjugat und SEB läuft zu langsam ab.

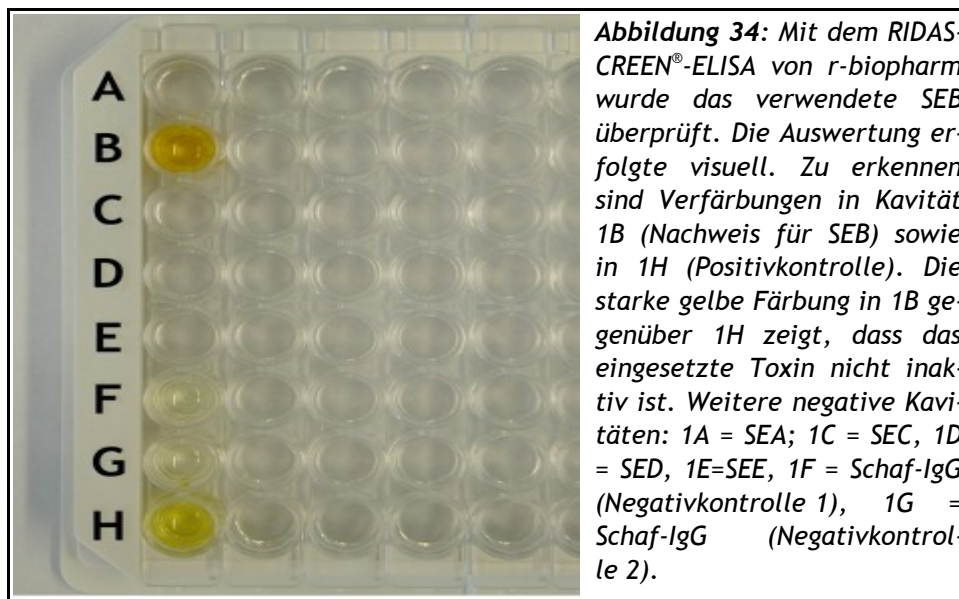
6. Die immunchemische Reaktion zwischen dem Fängerantikörper auf der Testlinie und dem Konjugat-SEB-Komplex läuft zu langsam ab.

6.2.2 Überprüfung der Fehlerquellen

Bei den beschriebenen möglichen Fehlerquellen handelt es sich um grundlegende Fehlerquellen bei der Entwicklung immunchemischer Schnelltests. Daher soll an dieser Stelle ausführlich auf die Untersuchung der Fehlerquellen eingegangen werden.

Qualität des Toxins

Das Auftreten nur unspezifischer bzw. kaum erkennbarer Testlinien in den durchgeführten Tests führte zu der Annahme, dass das eingesetzte SEB möglicherweise inaktiviert wurde. Die Tests werden daher mit einer neuen Charge SEB wiederholt und parallel mit einem kommerziell erhältlichen RIDASCREEN®-ELISA-Test (r-biopharm, Deutschland) überprüft.



Die Wiederholung der Versuche zeigt das gleiche unbefriedigende Ergebnis wie die ersten Durchführungen. Die Untersuchungen der Toxinproben mit dem ELISA-Test zeigten ein deutlich positives Signal (Abb. 34), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die eingesetzten Toxinproben für die ausgeführten Tests verwendbar waren.

Benetzung der Proteinlinien

Es ist ein bekanntes Phänomen bei Schnelltests, dass die aufgetragenen Proteinlinien während der Testdurchführung nicht ausreichend mit Probenlö-

sung benetzt werden. Häufig beobachtet wird ein sog. „Unterlaufen“ der Proteinlinien. Dabei bleibt die Linie scheinbar trocken, während die Probenflüssigkeit hinter der Linie weiter den Teststreifen entlang zieht. Oft werden die Proteinlinien zwar benetzt, die Benetzung erfolgt aber ungleichmäßig und nicht in Form einer gleichmäßigen Flüssigkeitsfront. Ursache für diese Benetzungsprobleme können die Zusammensetzung des Applikationspuffers I (S. 176) sein sowie die Vorbehandlung des Conjugate Pads [Millipore, 1998]. Diese Faktoren sollen in zwei weiteren Experimenten untersucht werden.

Die Veränderung der Zusammensetzung des Applikationspuffers (KPP-Puffer statt Borat-Puffer bei pH 8, keine Succrose) erbringt keine positiven Effekte hinsichtlich der Testsignale. Sie sind ebenso uneinheitlich wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

In einem weiteren Versuch wird die Conjugate-Pad-Vorbehandlung (Detergenzien, Additive, Elektrolyte) leicht verändert. Statt des standardmäßig verwendeten Imprägnierungspuffers I (Kap. 2) wird Imprägnierungspuffer II (50 mmol, pH 8,0, S. 177) zur Vorbehandlung eingesetzt. Die Tests werden in der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Weise durchgeführt.

Durch Veränderung dieser Bedingungen werden keine positiven Effekte erzielt. Auch in diesem Fall zeigt sich ein uneinheitliches Bild der Testsignale.

Weder die Zusammensetzung des Applikationspuffers I noch die Vorbehandlung der Conjugate Pads scheinen also ursächlich für die beschriebenen Schwierigkeiten zu sein.

Auswaschung der Proteinlinien

Eine Auswaschung der Proteine von der Testlinie durch die Probenlösung ist zwar unwahrscheinlich, da CN-Membranen i.A. über eine sehr starke unspezifische Proteinbindung verfügen (s.a. Theoretischer Teil, Kap. 2.7). Die Auswaschung ist zudem unwahrscheinlich, da in der ersten Versuchsreihe zumindest unspezifische Signale erkennbar waren. Dennoch soll die mögliche Fehlerquelle mit Blindtests mit KPP-Puffer I (S. 178) ausgeschlossen werden. Die Testdurchführung erfolgt nach der Standard-Vorschrift, allerdings ohne Toxin und Antikörper-Gold-Konjugat. Nach dem Test werden die Teststreifen mit einer Protein-Färbelösung (0,5% (w/w) Ponceau S in 5% (w/w) Essigsäure, S. 177) behandelt, um die auf den Linien verbliebenen Proteine sichtbar zu machen. Die gebrauchten Teststreifen werden dazu zunächst getrocknet (30 min, 40 °C), danach einzeln mit jeweils 3 mL Färbereagenz behandelt (20 min, La-

borschüttler) und schließlich dreimal mit je 3 mL 5%iger (w/w) Essigsäure gewaschen.

Es erfolgt ein Vergleich mit ebenfalls Ponceau S-gefärbten, unbenutzten Teststreifen, wobei festgestellt wird, dass zwar beim Unisart CN 200-Material deutliche Auswascheffekte zu erkennen sind, die aber nicht den totalen Signalverlust im Test bzw. unspezifische Testsignale erklären können. Bei den anderen für die Tests verwendeten Membranmaterialien sind keine Auswascheffekte zu erkennen.

Blockierung der Membran mit BSA

































Diese zunächst vermutete Fehlerquelle kann ausgeschlossen werden, da BSA im Conjugate Pad in deutlichem Überschuss vorliegt. Außerdem würde eine mangelnde Blockierung der Membran zu einer rötlichen Verfärbung führen, die auf unspezifische Bindungen des Konjugates an die Membranoberfläche zurückzuführen ist.

Immunchemische Reaktion zwischen Konjugat und SEB

Um zu untersuchen, ob die Reaktion zwischen anti-SEB_{Schaf}-Konjugat und SEB schnell genug abläuft, wird die Standard-Testdurchführung leicht modifiziert. Es werden 150 µL einer SEB-Lösung in KPP-Puffer III (1 µg/mL, S. 178) in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt, mit jeweils 3,6 µL anti-SEB_{Schaf}-Konjugat versetzt und gut durchmischt. Die Proben werden für 30, 60, 90 und 120 min bei RT inkubiert und anschließend mit verschiedenen Teststreifen (Membrantypen CN 140, CN 200, Conjugate Pads: Standard) untersucht.

Auch bei diesen Versuchen werden, wie die visuelle Auswertung zeigt, keine einheitlichen Ergebnisse erhalten (Tab. 8). Eine Färbung der Testlinie tritt kaum bis gar nicht auf. Die Inkubationszeit zwischen Konjugat und SEB kann also nicht allein ursächlich für das Misslingen der Tests sein.

Tabelle 8: Ergebnisse bei verlängerter Inkubationszeit zwischen SEB und Anti-körper-Gold-Konjugat.

Fänger-antikörper	Zeit [min]			
	30	60	90	120
Membran CN 140				
anti-SEB _{Schaf}	 	 	 	 
anti-SEB _{Kaninchen}	 	 	 	 
Membran CN 200				
anti-SEB _{Schaf}	 	 	 	 
anti-SEB _{Kaninchen}	 	 	 	 

Immunchemische Reaktion zwischen Fängerantikörper und Konjugat-SEB-Komplex

Um zu untersuchen, ob die Reaktion zwischen Konjugat-SEB-Komplex und Fängerantikörper schnell genug abläuft, wird die Standard-Testdurchführung leicht modifiziert. Die Durchführung erfolgt analog zu der in Kap. 6.1.1 beschriebenen Durchführung, nur dass anstelle der Membranstanzlinge jetzt die Testbereiche der fertigen Teststreifen verwendet werden. Die Blockierungs- und Inkubationsschritte werden nicht verändert.

Bei der Auswertung zeigen sich auf den Teststreifen sehr schwache Färbungen der Testlinien, die bei den ebenfalls erstellten Negativproben nicht auftreten. Das deutet darauf hin, dass tatsächlich eine immunchemische Reaktion zwischen Konjugat-SEB-Komplex und Fängerantikörper stattgefunden hat. Die nur schwache Färbung kann auf die große Verdünnung des Antikörper-Gold-Konjugates zurückgeführt werden.

Fazit nach den ersten Tests

Nach intensiven Untersuchungen muss festgestellt werden, dass mit den vorliegenden Antikörpern und dem Standard-Membranmaterial für LFD-Anwendungen kein SEB-Schnelltest aufgebaut werden kann. Grund dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die zu langsame immunchemische Reaktion der verwendeten Antikörper mit dem eingesetzten SEB.

6.2.3 Versuche mit anderen Membranmaterialien

Nach den Ergebnissen im vorangegangenen Abschnitt soll dem Problem der zu langsamen immunchemischen Reaktionen zwischen SEB und den eingesetzten Antikörpern mit der Verwendung anderer Membranmaterialien begegnet werden. Das bisher benutzte LFD-Material soll durch andere, feinerporige Membranen ersetzt werden. Ziel dabei ist, die Fließgeschwindigkeit der Probenflüssigkeit durch den Teststreifen zu verringern und damit einen innigeren und längeren Kontakt zwischen SEB, Konjugat und Fängerantikörper herzustellen, der letztendlich in einem funktionierenden Test resultieren soll.

Eingesetzt werden sollen für die folgenden Versuche die Sartorius CN-Membranen 11302 (Porengröße 3 µm) und 11303 (Porengröße 1,2 µm). Diese Materialien sind vom Hersteller für die Verwendung in der diagnostischen Probenvorbereitung bzw. im Bereich der Partikelanalyse vorgesehen. Sie sind bisher nicht auf ihre Eignung als LFD-Materialien untersucht worden. Da die Membra-

nen nicht in Rollenform, sondern nur als Blätter vorliegen, müssen vor dem Linienauftrag und dem Zusammenbau der Einzelkomponenten entsprechende Streifen (250x25 mm) per Hand geschnitten werden. Testaufbau und Versuchsdurchführung der folgenden Untersuchungen entsprechen ansonsten den bereits beschriebenen Standardbedingungen.

Versuche mit der Sartorius CN-Filtermembran 11302

Bei der Vorbereitung der Teststreifen mit diesem Material treten kaum Schwierigkeiten auf. Lediglich die elektrostatische Aufladung der Membranstreifen ist stärker als beim üblichen LFD-Material. Den daraus folgenden Schwierigkeiten beim Auftrag der Proteinlinien kann aber durch die Verwendung eines Ionisierungsgebläses (Sartorius AG, Göttingen) begegnet werden.

Das 11302-Material zeigt eine deutlich langsamere Fließgeschwindigkeit und eine längere Testdauer (min. 15-20 min) als das LFD-Material (Testdauer ca. 5-15 min). Allerdings kann auch mit diesem Material kein funktionierender Test aufgebaut werden. Wie bei den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Tests kommt es lediglich zu unspezifischen Bindungen des SEB-Konjugat-Komplexes an die Test- und Kontrolllinien. Außerdem zeigen sich die Nachteile zu kleiner Porengrößen anhand einer deutlichen und dauerhaften rötlichen

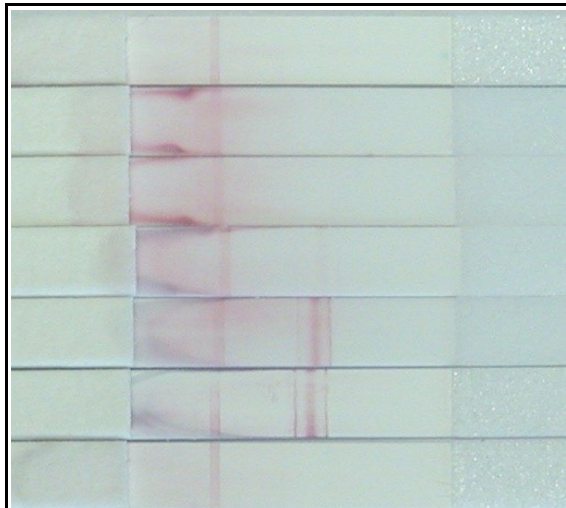


Abbildung 35: Aufnahmen von Teststreifen mit 11302-Membranen unter den beschriebenen Testbedingungen. Deutliche Schlierenbildung ist erkennbar, ebenso der sog. „Autobahn-Effekt“ um die Testlinie.

„Schlierenbildung“ auf dem gesamten Teststreifen, vor allem aber am oberen Ende der Membran (Abb. 35). Wie in Abb. 35 ebenfalls deutlich zu erkennen ist, tritt neben den Schlieren an der Testlinie auch der sog. „Autobahneffekt“ auf. Die Testlinie verfärbt sich dabei nicht einheitlich, sondern weist helle und dunkle Streifen quer zur Laufrichtung des Tests auf. Dieser Effekt ist u.a. auf Benetzungsprobleme der Proteinlinie zurückzuführen, die auch durch eine zu hohe Proteinkonzentration im Bereich der Testlinie zurückzuführen sind. [Whatman]. Eine so gestaltete Verfärbung der Teststreifen ist nicht akzeptabel, da zum einen Missverständnisse bei der visuellen Auswertung über die

tatsächliche Färbung der Testlinie entstehen können. Zum anderen wird eine digitale Auswertung der Teststreifen durch die starke Hintergrundfärbung vollständig verhindert.

Versuche mit der Sartorius CN-Filtermembran 11303

Auch beim noch feinerporigen 11303-Material ist die elektrostatische Aufladung der Membranstreifen stärker als beim LFD-Material. Auch in diesem Fall kommt beim Linienauftrag das Ionisierungsgebläse zum Einsatz.

Die 11303-Membran zeigt eine noch geringere Fließgeschwindigkeit als das 11302-Material und eine wiederum entsprechend längere Testdauer (25-30 min). Allerdings kann mit diesem Membrantyp erstmals überhaupt SEB in den untersuchten Proben nachgewiesen werden. Eine Verdünnungsreihe mit SEB-Konzentrationen zwischen 0,1-10 µg/mL zeigt deutliche Färbungen der Test- und Kontrolllinien, jedoch kann in mehreren Wiederholungsversuchen lediglich der SEB-Nachweis in einem Konzentrationsbereich von 0,25-10 µg/mL reproduziert werden (Abb. 36). Außerdem zeigt sich auch in diesen Testreihen - wie in den Versuchen mit LFD-Material - kein einheitlicher, der Konzentrationsreihe entsprechender Verlauf der Testlinienintensitäten.

Zudem kommt es wie auch beim 11302-Material während der Testdurchführung zu deutlichen unspezifischen Bindungen zwischen dem Antikörper-Gold-Konjugat und der Membran, die ebenfalls zu dauerhaften roten Schlieren führt. Auch in diesem Fall wird die Testauswertung durch die Schlieren deutlich beeinträchtigen. Schließlich zeigt die Auswertung der Testreihen außerdem, dass höhere SEB-Konzentrationen (≥ 10 µg/mL) zu einer deutlichen Abnahme des Testsignals bzw. sogar zu einem Falsch-Negativ-Signal führen (siehe Abb. 36, unterer Teststreifen).

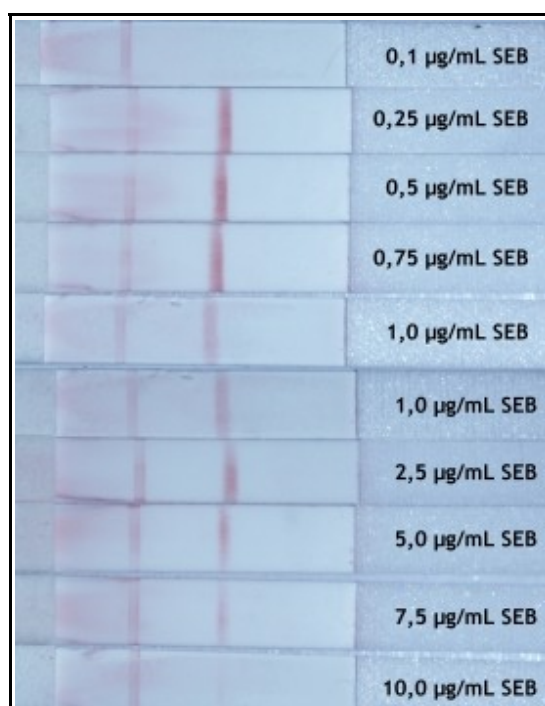


Abbildung 36: Testergebnisse mit Sartorius CN-Filtermembran 11303 von 0,1-10,0 µg/mL SEB unter den beschriebenen Testbedingungen. Deutlich erkennbar ist die Schlierenbildung im Bereich der Kontrolllinie.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit Filtermaterialien lassen sich folgende Schwierigkeiten für die Testentwicklung erkennen:

1. Unspezifische Bindungen des Antikörper-Gold-Konjugates an die Membran führt zur dauerhafter Schlierenbildung
2. Hohe SEB-Konzentrationen führen zu einer Abnahme des Testsignals bzw. zu Falsch-Negativ-Signalen

Im Folgenden Abschnitt sollen die genannten Schwierigkeiten genauer beleuchtet werden.

Schlierenbildung durch unspezifische Bindungen des Antikörper-Gold-Konjugates an die Membran

Es wird vermutet, dass die Schlierenbildung auf einer abrupten Verblockung der Membranporen durch eine zu hohe Proteinmenge auf der Testlinie beruht. Eine Verblockung würde zu einer deutlichen Verringerung oder sogar zu einem Stopp der Fließgeschwindigkeit entlang des Teststreifens führen, was wiederum die unspezifischen Bindungen zwischen Antikörper-Gold-Konjugat und Membranmaterial begünstigen würde. Um diese Fehlerquelle auszuschließen wird die Konzentration der aufgetragenen Proteinelösung von 1 mg/mL auf 0,5 mg/mL verringert.

Die beschriebene Maßnahme führt allerdings lediglich zu einer Intensitätsabnahme der Testsignale im untersuchten Konzentrationsbereich und somit zu einer nicht erwünschten Verringerung der Sensitivität des Schnelltests. Die Schlierenbildung kann auf diese Weise nicht verhindert werden.

Abnahme des Testsignals bei hohen SEB-Konzentrationen

Für die Abnahme der Intensität des Testsignals bei höheren SEB-Konzentrationen kommen drei Ursachen in Frage.

1. In LFD-Tests ist vielfach zu beobachten, dass die Probenflüssigkeit schneller in dem Teststreifen aufsteigt als das resolvatisierte Antikörper-Gold-Konjugat. Bei diesem Phänomen, dass durch die Benetzungseigenschaften der verwendeten Membranen hervorgerufen wird, spricht man von einer „Doppelfront“. Eine solche Doppelfront führt auch im vorliegenden Fall dazu, dass die Probenlösung die Testlinie erreicht, bevor die Antikörper-SEB-Komplexe dieses tun. Liegt nun eine hohe SEB-Konzentration in der Probenlösung vor, könnte bereits eine Absättigung der Bindungsstellen der Fängerantikörper auf der Testlinie

stattfinden, bevor die Antikörper-SEB-Komplexe die Testlinie erreichen. Die blockierten Fängerantikörper wären dann nicht mehr in der Lage, die für ein Testsignal erforderlichen Sandwich-Komplexe zu bilden. Dem Phänomen der Doppelfront ist mit den zur Verfügung stehenden Mitteln kaum zu begegnen, da hierfür eine umfassende Untersuchung und Modifikation der Conjugate-Pad-Vorbehandlung nötig wäre. An dieser Stelle kann lediglich eine erhöhte Konzentration markierter Antikörper bzw. ein größeres Volumen an Antikörper-Gold-Konjugat Abhilfe schaffen. Allerdings sind auch der Erhöhung des Konjugat-Volumens Grenzen gesetzt, um eine Überbeladung der verwendeten Membran und daraus resultierende Schwierigkeiten zu vermeiden.

Selbst eine Verdoppelung des Konjugat-Volumens erbringt in entsprechenden Versuchen keinen positiven Effekt für die Intensität der Testlinien bei hohen SEB-Konzentrationen. Durch die größere Menge an Antikörper-Gold-Konjugat nimmt lediglich die Schlierenbildung im oberen Teil der Teststreifen zu.

2. Bei einer Erhöhung der Antigenkonzentration in der Probenflüssigkeit kann es schon allein aus sterischen Gründen zu einer Hemmung der Antikörper-Antigen-Bindung und damit der Ausbildung von Antikörper-SEB-Komplexen kommen. Dieser Tatsache wäre bei einem Schnelltest lediglich durch eine große Verdünnung der Probenlösung zu begegnen. In einem solchen Fall müssten also mehrere Tests der Probenlösung in verschiedenen Verdünnungsstufen vorgenommen werden.
3. Bei der Verwendung von PAb kann es aufgrund der unvorhersagbaren Zielepitope der einzelnen Antikörper am SEB zu Quervernetzungen zwischen mehreren Antikörpern und Antigenmolekülen kommen. Durch die Bildung derartiger Riesen-Komplexe kann die Ausbildung der erforderlichen Sandwich-Komplexe zwischen markiertem Antikörper, Antigen und Fängerantikörper behindert werden, was wiederum ein weniger intensives Testsignal ergeben würde. Außerdem könnten derartig große Zusammenballungen auch zu Verstopfungen der Membranstruktur oder zu unspezifischen Bindungen an die Membranoberfläche führen.

Das hier beschriebene Phänomen kann durch die alternative Verwendung von MAbs untersucht werden, da diese dank ihrer eindeutigen Spezifität für bestimmte Epitope nicht zu Quervernetzungen führen soll-

ten.

6.2.4 Fazit

Als Zwischenergebnis kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass mit den zur Verfügung stehenden PAb als Nachweisreagenzien und den anderen Materialien (Membranen, Pads) kein zufriedenstellender immunchemischer LFD-Test für SEB aufgebaut werden kann. Nach verschiedenen Modifikationen eines Standard-LFD ist zwar der Nachweis des Zielanalyten SEB in KPP-Puffer in einem Konzentrationsbereich von 0,25-10 µg/mL grundsätzlich möglich und auch reproduzierbar. Jedoch erscheint dieser Nachweisbereich mit Blick auf die spätere Anwendung eines SEB-Schnelltests zu klein. Es wäre wünschenswert, sowohl die Nachweisgrenze zumindest deutlich in den ppb-Bereich (ng/mL) zu verschieben als auch den Nachweisbereich möglichst groß zu halten. Nicht akzeptabel sind auch die auftretenden Verfärbungen des gesamten Teststreifens, die trotz verschiedener Modifikationen nicht verringert werden konnten. Im Hinblick auf die Verwendung eines SEB-Schnelltests durch ungeschulte Anwender muss sichergestellt werden, dass die Ergebnisse auf einem Teststreifen eindeutig ablesbar sind und möglichst keinen Interpretationsspielraum lassen.

Eine weitere Herausforderung ist an dieser Stelle die Untersuchung der Zuverlässigkeit des in dem erfolgreichen Test verwendeten Membranmaterials. Dieses ist eigentlich nicht für LFD-Anwendungen entwickelt worden und seine Herstellung erfolgt auf der Grundlage anderer Anforderungen. Es wäre notwendig, das Material und den Herstellungsprozess umfangreichen Testreihen zu unterziehen, um eine gleichbleibende, den Ansprüchen eines LFD-Tests genügende Membranqualität sicherzustellen.

Um ein zuverlässiges, für die standardmäßige Anwendung verwendbares, Testsystem aufzubauen, wären also weitere Arbeiten notwendig. Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten ist es jedoch fraglich, ob diese Arbeiten mit den zur Verfügung stehenden Materialien zu einem allen Ansprüchen genügenden LFD-Test führen würden. Es erscheint an dieser Stelle eher sinnvoll, die Arbeiten mit anderen Ausgangsmaterialien, vor allem in Bezug auf die Antikörper, fortzuführen. Antikörper aus anderen Quellen bieten möglicherweise Vorteile hinsichtlich der Reaktionszeit, was wiederum in der Verwendbarkeit standardmäßiger Diagnostikmaterialien resultieren könnte. Da mit MAbs beispielsweise auch die beschriebene Schwierigkeit der Quervernetzung umgan-

gen werden könnte, bietet es sich an, diese Antikörper für weitere Arbeiten zu verwenden.

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

Nach weiteren Recherchen konnten geeignete und hinreichend kostengünstige murine Mab ermittelt werden. Die beiden Antikörper S222 und S643 (Hy-Test Ltd., Turku, Finnland) wurden im ELISA-Format bereits erfolgreich eingesetzt und sollten hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Kreuzreaktivität etc.) für einen Einsatz in LFD-Tests geeignet sein [HyTest, 2004].

Auch mit der Weiterführung der Arbeiten an einem SEB-Schnelltest soll vor der endgültigen Optimierung eines Konjugationsprotokolls begonnen werden. Erneut wird folglich eine Probe eines der zur Verfügung stehenden Antikörper außer Haus konjugiert (Alchemy Ltd.). Zur Konjugation wird nach den Herstellerangaben der anti-SEB_{Maus} S643 verwendet. Das erhaltene Konjugat hat eine optische Dichte von 10,0 bei 530 nm in Borat-Puffer mit 10% Sucrose bei pH 9 verwendet [Alchemy, 2004].

6.3.1 Erste Versuche mit fremdkonjugiertem Goldkonjugat

Testreihen unter Standardbedingungen

Aus Zeit- und Kostengründen wird auf eine eingehende Untersuchung des erhaltenen Konjugates auf Membranstanzlingen verzichtet und sofort mit den Versuchen auf Teststreifen begonnen. Dazu wird eine Sartorius Unisart CN 140-Membran nach der Standardvorschrift mit einer Lösung des anti-SEB_{Maus} S222 (1 mg/mL) belegt. Der Aufbau der Teststreifen und die Durchführung der Tests erfolgt zunächst unter den in den Kap. 2 und Kap. 3 beschriebenen Standardbedingungen. Als Konjugatvolumen werden

3,6 µL eingesetzt. Die Proben werden aus einer Verdünnungsreihe von SEB in KPP-Puffer III (S. 178) mit Konzentrationen zwischen 1-10.000 ng/mL genommen.

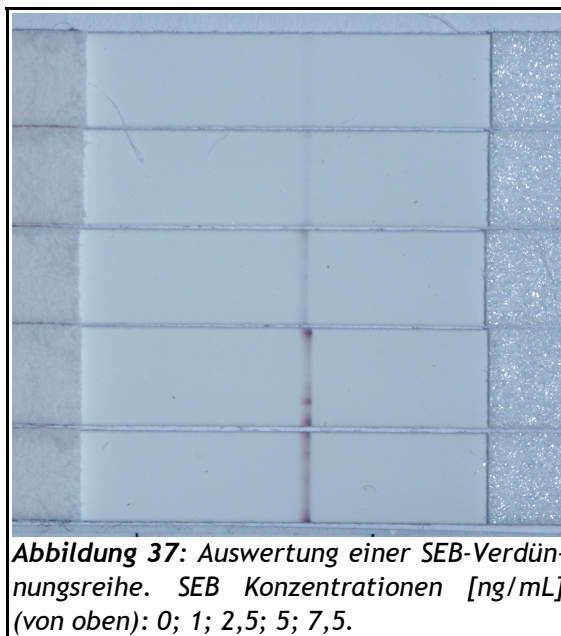
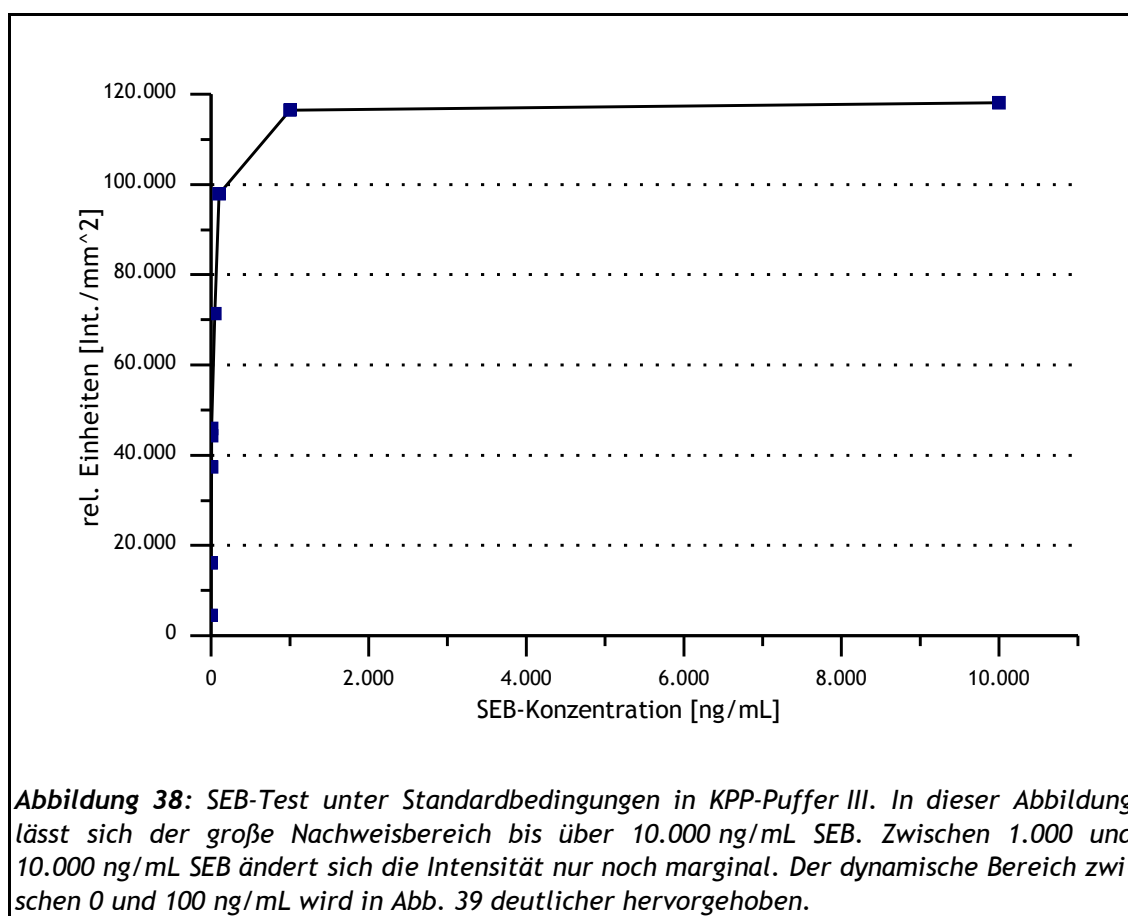
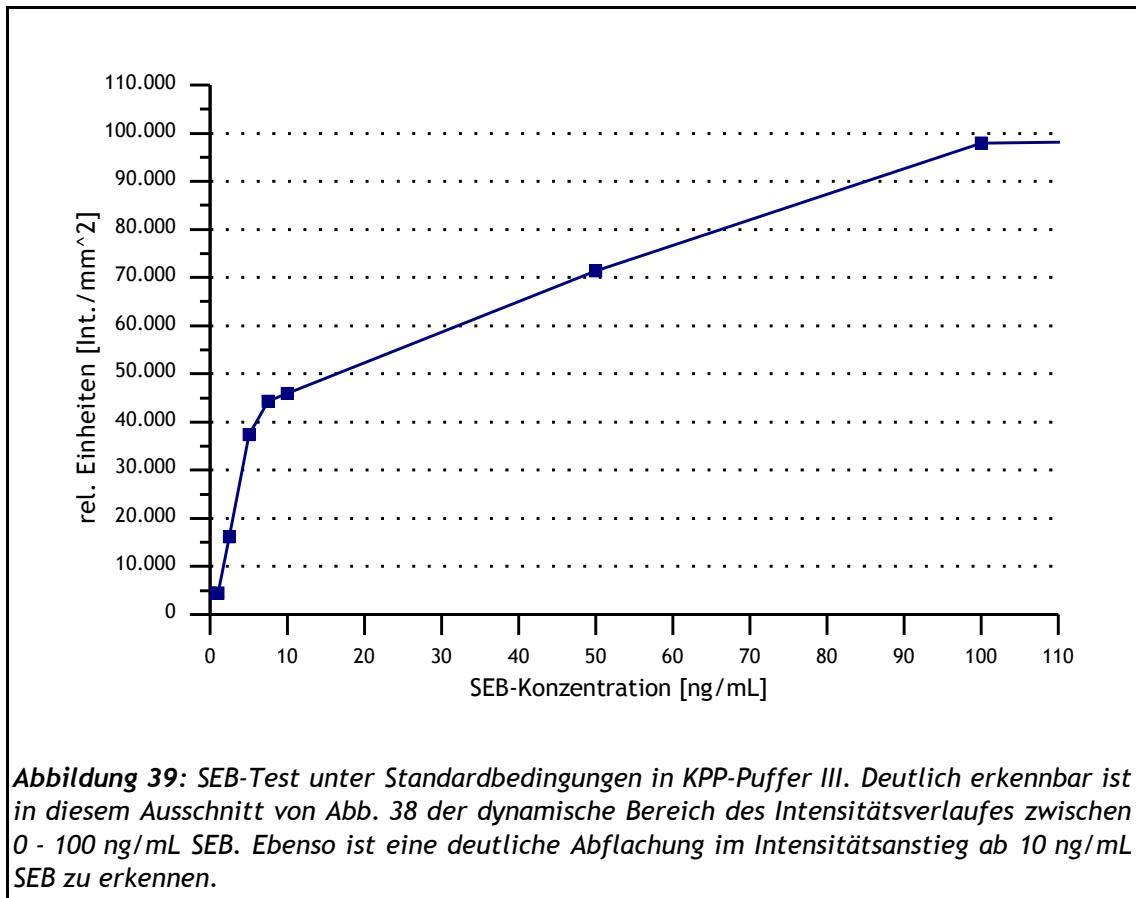


Abbildung 37: Auswertung einer SEB-Verdünnungsreihe. SEB Konzentrationen [ng/mL] (von oben): 0; 1; 2,5; 5; 7,5.

Der Test verläuft zunächst ideal. Nach 15 min kann schon visuell ein eindeutiges Testergebnis abgelesen werden (Abb. 37). Da keine rötlichen Verfärbungen auf den Teststreifen zu erkennen sind, kann auch erstmals bei einem SEB-Test die digitale Auswertung zum Einsatz kommen. Die daraus resultierenden Werte sind in Abb 38 und Abb. 39 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Linienintensität mit zunehmender SEB-Konzentration in der Probe zunimmt und eine Auftragung der Intensität gegen die Konzentration den für immunchemische Sandwich-Tests typischen Kurvenverlauf annimmt. Der dynamische Bereich erstreckt sich in etwa von 1-1000 ng/mL, wobei die deutlichsten Intensitätsunterschiede zwischen 0-10 ng/mL SEB auftreten. Danach flacht die Kurve sichtbar stark ab. Ein deutlicher Signalunterschied lässt sich bereits zwischen 1 ng/mL und 2,5 ng/mL SEB ausmachen (Abb. 39). Aus der Grafik lässt sich allerdings auch entnehmen, dass das Signal der Nullprobe nahezu mit dem Signal für 1 ng/mL übereinstimmt (s.a. Abb. 37, Streifen 1 und 2 von oben). Mit Sicherheit können mit diesem Test folglich nur SEB-Konzentrationen ab 2,5 ng/mL detektiert werden. Die erhaltenen Resultate können in Wiederholungsversuchen bestätigt werden.





Zwar hat der aufgebaute Test grundsätzlich funktioniert. Das erhaltene Testergebnis ist aber nicht optimal, da das durch die Nullprobe verursachte, deutlich erkennbare Farbsignal bei der Auswertung zu Fehlinterpretationen führen kann. Es ist ein eindeutiger Unterschied zwischen SEB-freien und SEB-kontaminierten Proben anzustreben.

Mögliche Fehlerquellen

Ein Falsch-positiv-Signal wie in den vorliegenden Testreihen kann auf verschiedenen Ursachen beruhen. Besonders interessant sind im vorliegenden Fall unspezifische Wechselwirkungen zwischen den gelösten Gold-Partikeln und den immobilisierten Fängerantikörpern [O'Farrell, 2005].

Ein Grund für unspezifische Wechselwirkungen kann beispielsweise in unzureichend abgesättigten Gold-Partikeln liegen. Wenn bei der Konjugatherstellung nicht alle Oberflächenplätze auf den Gold-Partikeln mit Proteinen abgesättigt wurden, können die Partikel aufgrund der deutlichen Anziehungskräfte, die zwischen der Goldoberfläche und den Proteinen (s.a. Theoretischer Teil, Kap. 2.7) herrschen, an die Fängerantikörper binden. Diese Bindungen

können sowohl über elektrostatische als auch über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen.

Ebenso können auch die Eigenschaften der verwendeten Fängerantikörper zu unspezifischen Bindungen führen. Hydrophobizität, unspezifische Immunreaktionen oder eine starke positive Ladung der Antikörper können Probleme verursachen.

6.3.2 Vorversuche zu Modifikationen des Standardsystems

Da keine anderen Antikörper zum Austausch in Optimierungsversuchen zur Verfügung stehen, soll zunächst der Einfluss weiterer Faktoren untersucht werden. Dabei soll ermittelt werden, inwieweit überhaupt die Signalintensität durch Modifikationen der Testkomponenten beeinflusst werden kann. Am schnellsten und praktikabelsten ist an diesem Punkt eine Veränderung des eingesetzten Konjugatvolumens bzw. der Zusammensetzung der Probenlösung zu realisieren. Sind die Vorversuche erfolgreich, sollen die erhaltenen Erkenntnisse systematisch auf die Testkomponenten angewendet werden. Dabei soll dann das Conjugate Pad im Mittelpunkt der Bemühungen stehen, da durch eine Modifikation seiner Vorbehandlung der größte Einfluss auf den Testverlauf genommen werden kann.

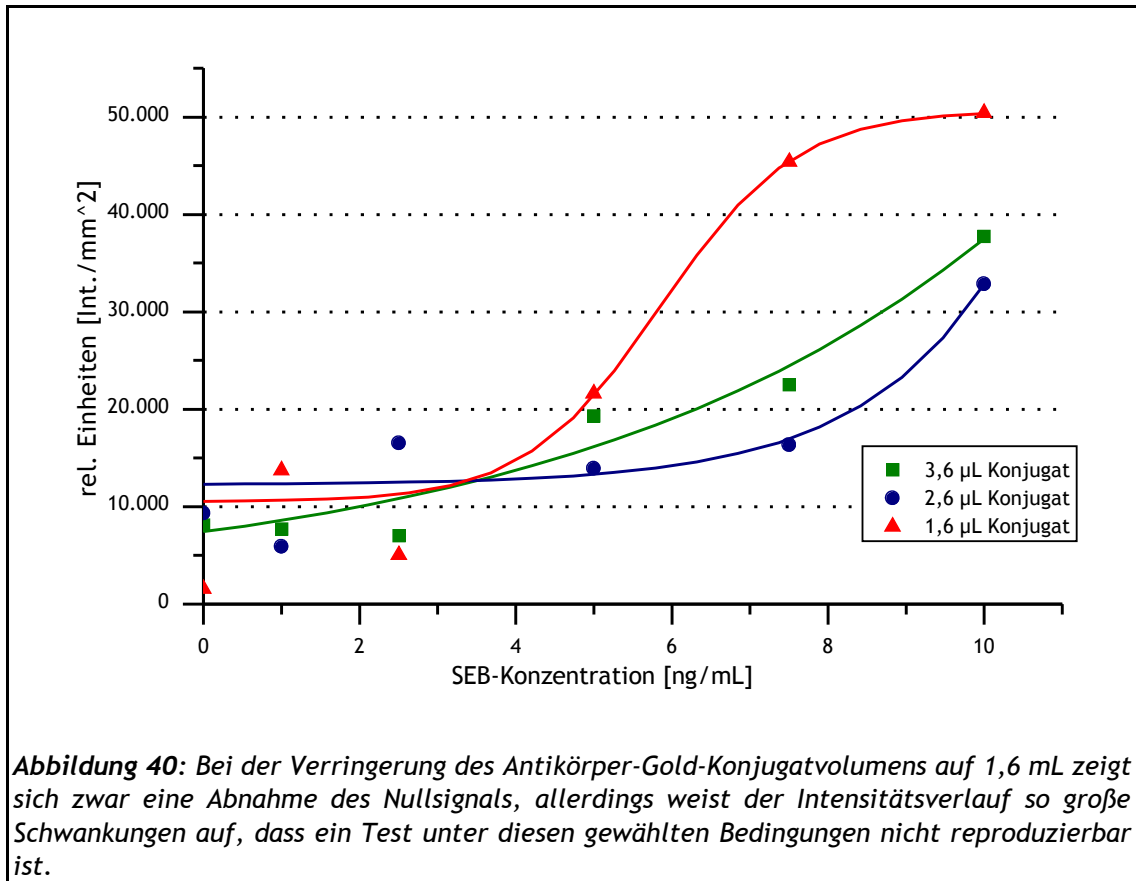
Veränderung des Konjugat-Volumens

Die im vorangegangenen Kapitel unternommenen Testreihen werden unter Standardbedingungen in einem SEB-Konzentrationsbereich von 0 - 7,5 ng/mL wiederholt. Dabei wird die eingesetzte Konjugatmenge schrittweise von 3,6 μL auf 1,6 μL verringert, um ein falsch-positives Signal zu unterdrücken. Eine Verringerung des Konjugatvolumens entspricht einer Verdünnung der Konjugatkonzentration bei gleichbleibendem Volumen, die an dieser Stelle nicht möglich ist, da die genaue Zusammensetzung des Konjugatpuffers nicht bekannt ist.

Es zeigt sich in den Versuchen, dass die Verringerung des Konjugatvolumens kaum zu einer Verringerung des Falsch-positiv-Signals führt (Abb. 40). Bei einem Konjugatvolumen von 3,6 μL und 2,6 μL unterscheidet sich das Falsch-positiv-Signal kaum. Zwar ist es bei 1,6 μL Konjugat deutlich geringer, es ist aber immer noch erkennbar. Zudem zeigt die Testlinienintensität bei diesem Konjugatvolumen mit Erhöhung der SEB-Konzentration starke Schwankungen und folgt erst ab 5 ng/mL SEB einem gleichmäßigen Trend. Die Konjugatmenge sollte also nicht auf 1,6 μL reduziert werden. Ein Grund für das indifferen-

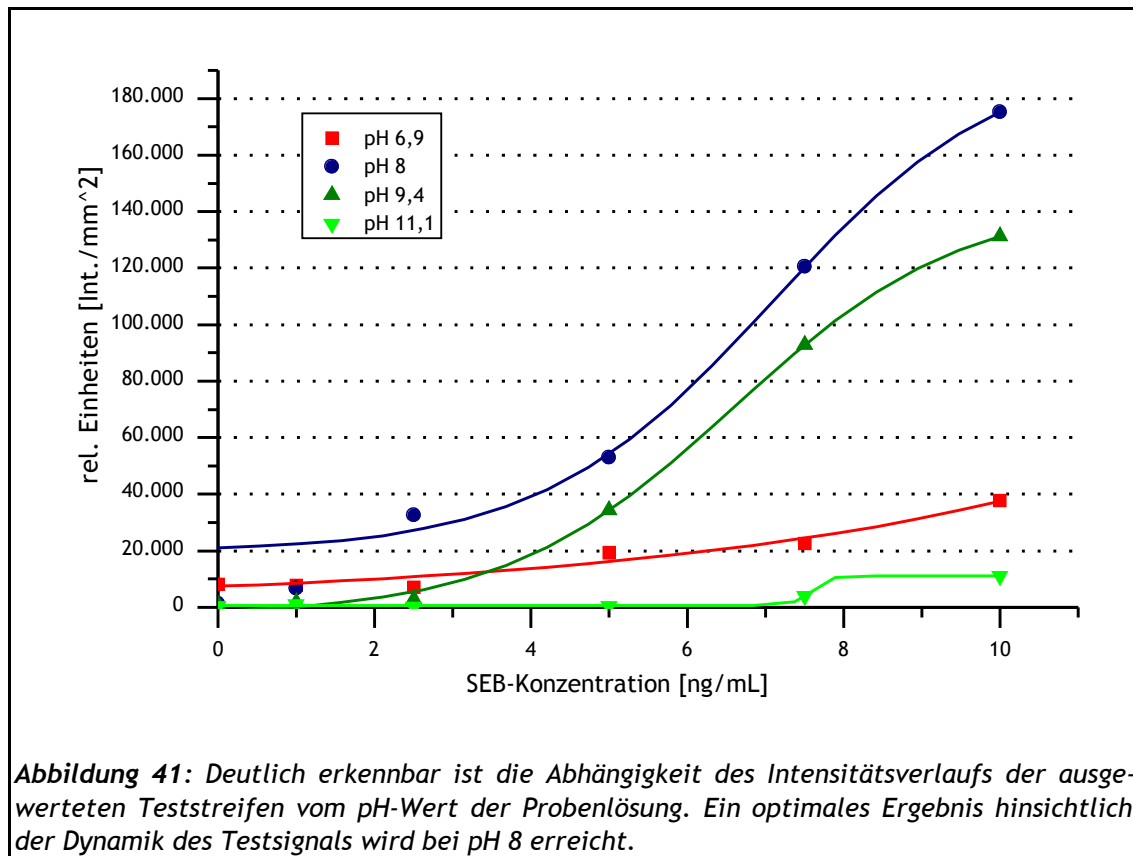
6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

te Testergebnis dieses Versuchsteils liegt in der mangelnden Reproduzierbarkeit der Teststreifenherstellung durch einen zu hohen Volumenfehler beim Konjugatauftrag mit der Mikroliterpipette. Eine Verdünnung des Konjugates anstelle einer Volumenverringerung könnte an dieser Stelle besser reproduzierbare Ergebnisse bringen.



Veränderung des pH-Wertes der Probenlösung

Um die Auswirkungen einer pH-Wert-Änderung auf den Testverlauf zu untersuchen, wird der pH-Wert des Probenpuffers von pH 6,9 (S. 179) schrittweise auf pH 11,1 erhöht. Der Testaufbau und die -durchführung erfolgen ansonsten unter Standardbedingungen in einem SEB-Konzentrationsbereich von 0-10 ng/mL. Nicht berücksichtigt wird in den Versuchen der puffernde Effekt der standardmäßigen Vorbehandlung des Conjugate Pads.



Die Testreihen mit den modifizierten Proben verlaufen wie geplant. Die verwendeten Teststreifen können direkt digital ausgewertet werden und liefern das in Abb. 41 dargestellte Ergebnis. An den Verläufen der Intensitätskurven lässt sich erkennen, dass eine Veränderung des pH-Wertes ein Optimum hinsichtlich der Dynamik des Intensitätsverlaufes durchläuft. Bei einem pH-Wert von pH 8 weist der Intensitätsverlauf ein sehr geringes Nullsignal auf und zeigt dennoch eine vergleichsweise große Steigung. Gegenüber dem Ausgangswert pH 6,9, dem pH-Optimum für die Lösung von SEB in wässrigem Medium, zeigt sich bei allen höheren pH-Werten eine allgemeine Abschwächung des Nullsignals. Es kann jedoch auch bei dieser Modifikation der Testdurchführung nicht vollständig unterdrückt werden.

Lediglich die bei pH 11,1 durchgeführte Testreihe zeigt ein kaum sichtbares Nullsignal. Allerdings verringert sich in dem Fall auch die Sensitivität des Teststreifens so erheblich, dass zwischen 0 ng/mL und 7,5 ng/mL SEB nur ein sehr geringer Unterschied in der Testlinienintensität zu erkennen ist. Ursache dafür werden höchstwahrscheinlich Hemmungen der immunchemischen Reaktionen sein. Ein auf pH 11,1 erhöhter pH-Wert wird einen deutlichen Einfluss

auf die Strukturen der beteiligten Proteine (SEB, Konjugat-Antikörper, Fängerantikörper) haben. Daraus resultieren entsprechende Einschränkungen hinsichtlich der Reaktivität der immunchemischen Komponenten.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der pH-Wert der Testumgebung einen ganz erheblichen Einfluss auf die Testlinienintensität hat. Es ist allerdings fraglich, inwieweit der pH-Wert der Testumgebung außer über den Probenpuffer variiert werden kann. Lediglich die Imprägnierung des Conjugate Pads bei verschiedenen pH-Werten steht dafür zur Verfügung.

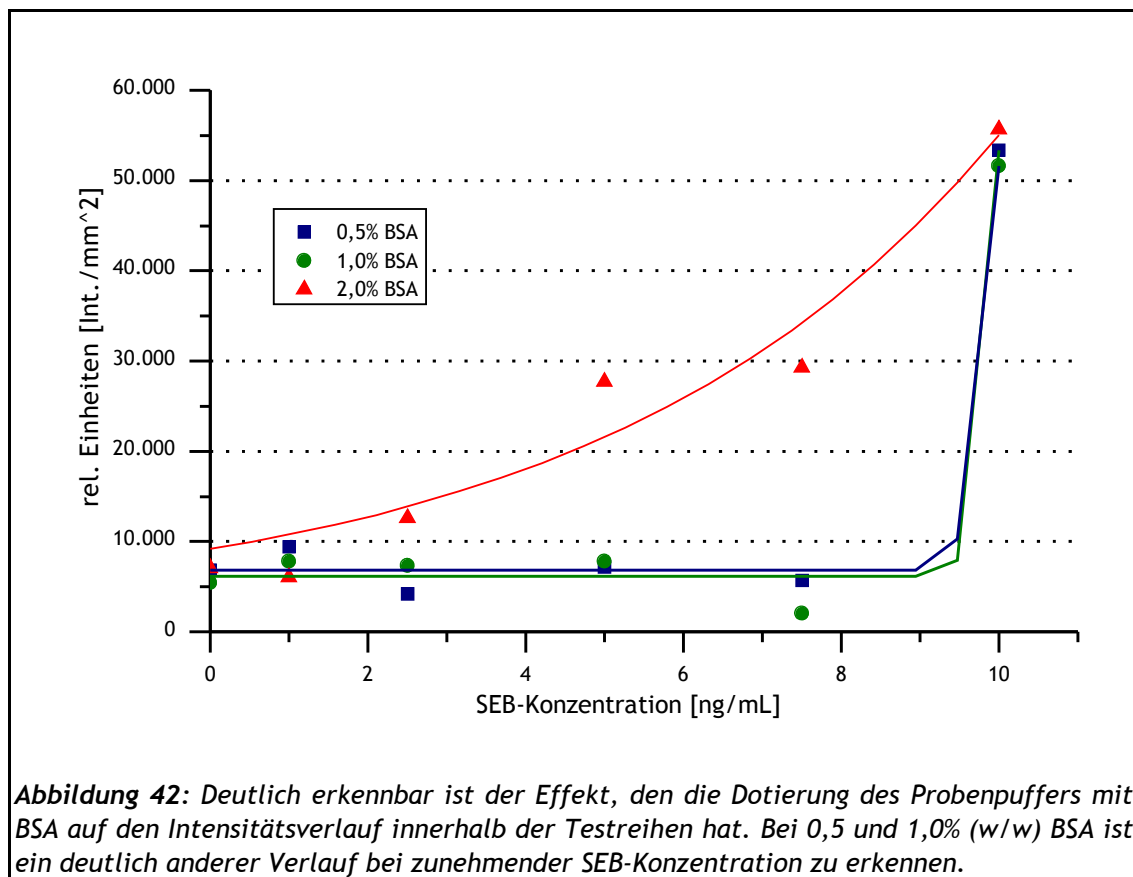
Zugabe von Detergenzien und Proteinen zur Probenlösung

Die Menge an Detergenzien, mit denen die Conjugate Pads vorbehandelt werden, kann ganz entscheidenden Einfluss auf den Testverlauf und die Signalintensitäten der Testlinie haben [Millipore, 1998], [Jones, 2002c]. Exemplarisch sollen die Auswirkungen der Detergenzien und Proteine anhand von BSA- und Tween 20®-Dotierungen des Probenpuffers untersucht werden. Dazu wird der als Probenlösung verwendete KPP-Puffer III (S. 178) zunächst schrittweise mit jeweils 0,5-2,0% (w/w) BSA dotiert. Mit den so erstellten Proben werden Testreihen unter den in Kap. 6.3.1 beschriebenen Bedingungen in einem SEB-Konzentrationsbereich von 0-10 ng/mL durchgeführt. Für die Versuchsreihen werden jeweils 3,6 µL Konjugat pro Teststreifen eingesetzt. Nicht berücksichtigt wird bei den Tests, dass die eingesetzten Conjugate Pads ebenfalls bereits mit BSA-haltigem Puffer imprägniert wurden.

Der Effekt, den die Dotierung des Probenpuffers mit BSA auf den Intensitätsverlauf innerhalb der Testreihen hat, ist in Abb. 42 deutlich erkennbar. Bei 0,5 und 1,0% (w/w) BSA ist ein deutlich anderer, flacherer Verlauf bei zunehmender SEB-Konzentration zu erkennen. Bei 2,0% (w/w) BSA verläuft der Intensitätsanstieg gleichmäßiger, und es sind bereits bei geringeren SEB-Konzentrationen deutliche Intensitätsunterschiede erkennbar. Erst bei einer SEB-Konzentration von 10 ng/mL gleichen sich die Testlinienintensitäten an.

Als eine Begründung für diesen Effekt wäre denkbar, dass ein zu hoher BSA-Gehalt in der Probenflüssigkeit unspezifische Bindungen des Antikörper-Antikörper-Gold-Konjugates an den Fängerantikörper unterstützt. Bereits bei geringeren Analytkonzentrationen würden sich so höhere Signalintensitäten ergeben. Das höhere Nullsignal der stark BSA-haltigen Probe wäre ein Hinweis darauf. Nicht erklären kann dieser Ansatz allerdings, warum das Signal im weiteren Verlauf schneller und deutlich gleichmäßiger ansteigt als bei den

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern



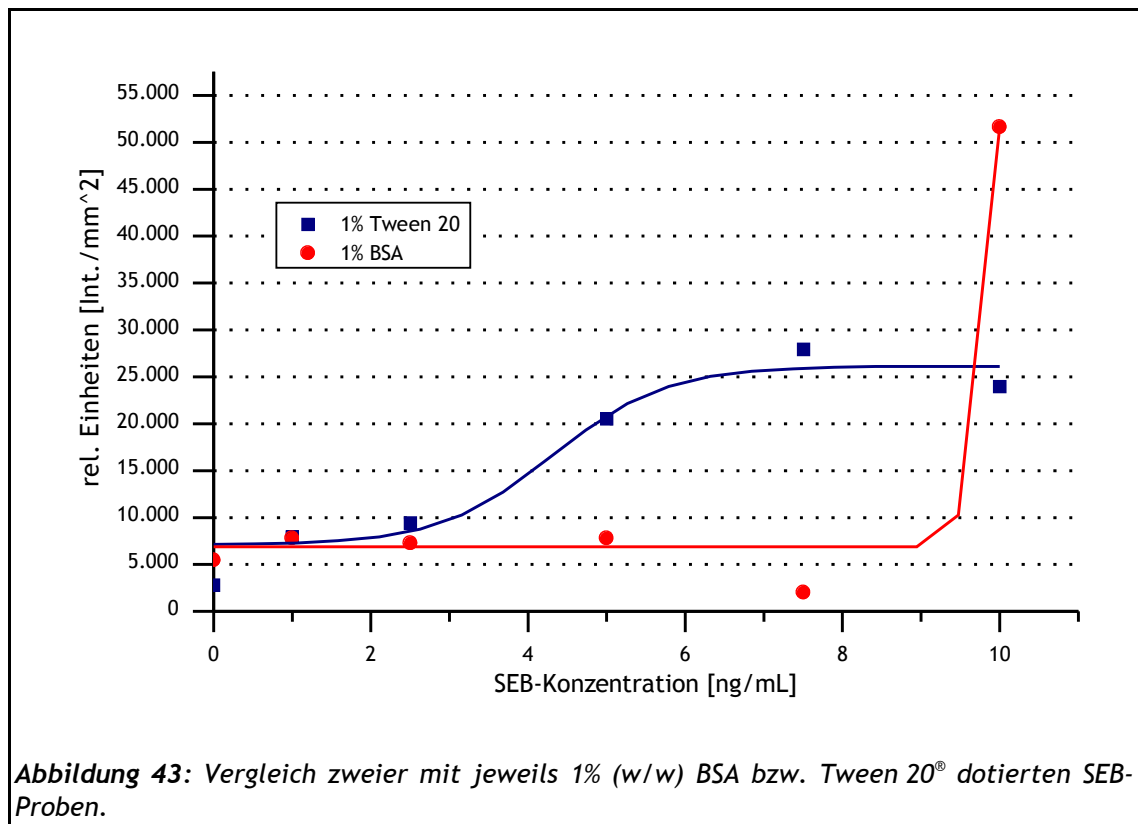
weniger BSA-haltigen Proben.

Möglich wäre auch, dass eine höhere BSA-Konzentration in der Probenflüssigkeit den Fluss durch den Teststreifen im Bereich der Testlinie verlangsamt und somit eine längere Reaktionszeit zwischen Sandwich-Komplex und Fänge-antikörper ermöglicht, in der auch bei geringerer Analytkonzentration vergleichsweise mehr Sandwich-Komplexe an die Testlinie binden können als bei geringere BSA-Konzentration.

Auch bei einer Dotierung der SEB-Proben mit Tween 20® ist ein Effekt auf den Intensitätsverlauf erkennbar. Wie unterschiedlich sich BSA- bzw. Tween 20®-Dotierungen auf die Intensitätsverläufe der Testreihen auswirken, ist exemplarisch in Abb. 43 beim Vergleich zweier mit jeweils 1% (w/w) BSA bzw. Tween 20® dotierten Proben dargestellt.

Während bei der mit BSA dotierten SEB-Verdünnungsreihe bei geringen SEB-Konzentrationen zunächst kein Anstieg der Testlinienintensität zu erkennen ist, zeigt sich bei Tween 20®-Dotierung schon zwischen der Nullprobe und einer Probe mit 1 ng/mL SEB ein deutlicher Unterschied. Der Anstieg der Intensität mit Zunahme der SEB-Konzentration verläuft bei den Tween 20®-dotier-

ten Proben gleichmäßiger, aber insgesamt schwächer, während er bei BSA-dotierten Proben schließlich sprunghaft verläuft.



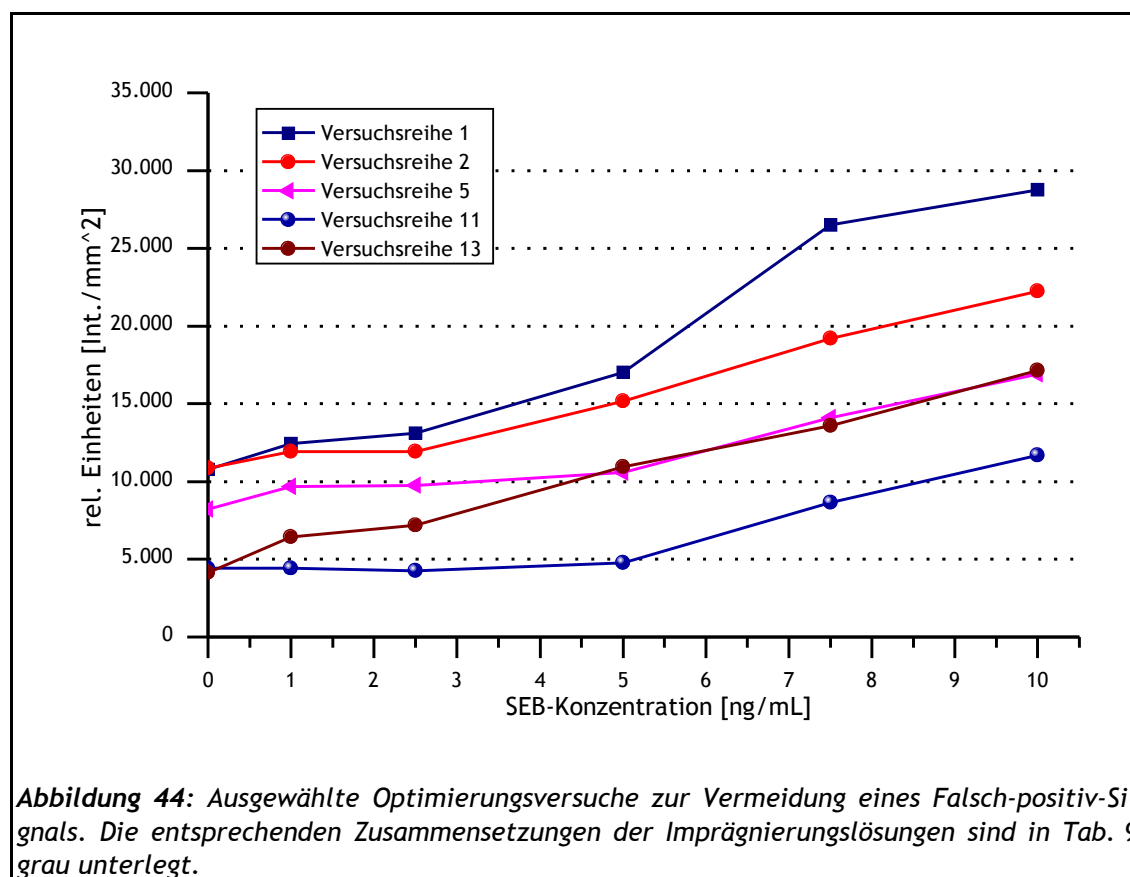
Insgesamt zeigen die Vorversuche eindeutig, dass die variierten Bedingungen einen Einfluss auf die Testlinienintensitäten innerhalb der einzelnen Verdünnungsreihen haben. Eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes erscheint sinnvoll und eine Optimierung der Variablen hinsichtlich einer guten Sensitivität bei gleichzeitiger Verringerung des Falsch-positiv-Signals möglich.

6.3.3 Einsatz des Simplex-Algorithmus zur Testmodifikation

In den Vorversuchen zeigte sich, dass der pH-Wert des Probenpuffers, die Dotierung des Probenpuffers mit BSA und Tween 20® sowie die Veränderung des Konjugatvolumens Einfluss auf den Testverlauf haben. Diese Phänome, die bisher nur in vereinfachter Form und auch nur einzeln betrachtet wurden, sollen nun mit Hilfe des Simplex-Algorithmus auch hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen aufeinander systematisch untersucht werden.

Als variable Faktoren für die Simplex-Untersuchungen stehen der pH-Wert des Testmilieus, das Volumen an Antikörper-Gold-Konjugat sowie die Konzen-

tration an BSA und Tween 20® im Testmilieu zur Verfügung. Anders als in den Vorversuchen soll in den Simplex-Testreihen nicht die Zusammensetzung des Probenpuffers, sondern die Zusammensetzung des Imprägnierungspuffers für die Conjugate Pads variiert werden. Dieses Vorgehen kommt einer späteren Teststreifenherstellung näher als die in den Vorversuchen beschriebene Testdurchführung. Nach den Vorversuchen sollte ein solches Vorgehen erfolgversprechend sein.



Um die Anzahl an Variablen und an zu erwartenden Versuchen übersichtlich zu gestalten, werden nur die Konzentrationen an BSA und Tween 20® im Imprägnierungspuffer I (S. 177) und das Konjugatvolumen in festgelegten Schrittweiten variiert. Die BSA-Konzentration wird dabei in Schritten von 0,5% in einem Bereich von 0,5-2,5% (w/w) verändert, die Tween 20®-Konzentration in Intervallen von 0,25% in einem Bereich von 0,25-2,0% (w/w). Das Konjugatvolumen wird in 0,5 µL-Schritten in einem Bereich von 2,0-4,0 µL variiert. Der pH-Wert des Imprägnierungspuffers wird konstant bei pH 8,0 gehalten. Ansonsten folgen Testaufbau und -durchführung den beschriebenen Standardbedingungen. Zur Versuchsplanung wird das bereits beschriebene Programm

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

Simplex 1.8 eingesetzt, das die jeweiligen Werte vorgibt. Als Bedingung wird die Minimierung des Signals der jeweiligen Nullprobe festgelegt.

Deutlich erkennbar sind die unterschiedlichen Kurvenverläufe in Abb. 44. Die Variation des Testaufbaus hat durchaus Auswirkungen auf die Testsignale. Dabei variieren sowohl die Testlinienintensitäten der Nullproben als auch der Verlauf der Intensitätskurven im dynamischen Bereich von 0-10 ng/mL SEB. Die Nullprobenintensitäten bewegen sich in einem Bereich von 10.875 rel. Einheiten (2,0% (w/w) Tween 20®; 0,5% (w/w) BSA, 2,5 µL Konjugat) bis 4.145 rel. Einheiten (0,5% (w/w) Tween 20®; 1,5% (w/w) BSA; 2,5 µL Konjugat). Es zeigt sich deutlich, dass eine Unterdrückung des Falsch-positiv-Signals in den Versuchen auch eine Verringerung der Sensitivität zur Folge haben kann. Am deutlichsten ist das bei einer Pufferzusammensetzung mit 1% (w/w) Tween 20®, 1% (w/w) BSA und der Verwendung von 2,5 µL Konjugat erkennbar. Hier unterscheiden sich die Testlinienintensitäten von 0-7,5 ng/mL SEB

Tabelle 9: Zusammensetzungen der verschiedenen Imprägnierungslösungen.

Versuch	Tween 20® [% (w/w)]	BSA [% (w/w)]	Konjugat [µL]
1	0,25	0,5	3,5
2	2,0	0,5	2,5
3	1,0	0,5	3,5
4	1,5	0,5	3,5
5	2,0	0,5	3,5
6	1,5	0,5	3,0
7	0,25	1,0	3,0
8	1,75	1,0	4,0
9	1,5	1,0	3,0
10	1,0	1,0	3,0
11	1,0	1,0	2,5
12	0,75	1,0	2,5
13	0,5	1,5	2,5
14	1,0	2,0	2,5
15	1,5	1,5	2,5
16	1,25	1,5	2,5
17	0,5	1,0	2,5
18	1,0	1,5	2,5

nur marginal. Dennoch ist aber auch in diesem Fall ein schwacher rötlicher Schatten auf der Testlinie der Nullprobe erkennbar. Ein Foto der Testreihe (Abb. 45, rechts) bestätigt diese Auswertung. Aber auch die Versuchsreihe mit der geringsten Nullprobenintensität von 4.145 rel. Einheiten (0,5% (w/w) Tween 20®; 1,5% (w/w) BSA; 2,5 µL Konjugat) zeigt auf dem Foto (Abb. , Mitte) nur geringe Unterschiede zwischen den vier gering konzentrierten Proben von 0-5 ng/mL SEB.

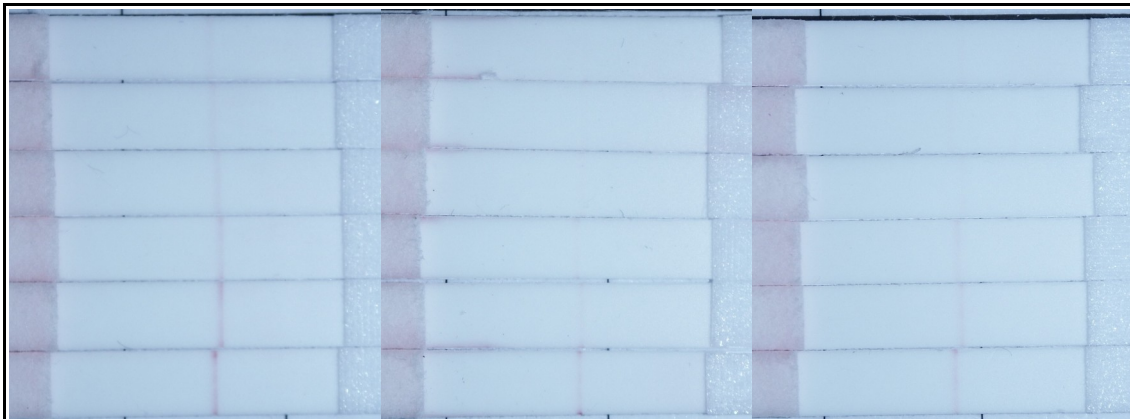


Abbildung 45: Deutlich erkennbar sind die Unterschiede in den Testlinienverläufen auch auf digitalen Fotos. Dargestellt sind die Teststreifen bei 0; 1; 2,5; 5; 7,5 und 10 ng/mL SEB (von oben). Auf dem linken Bild (2,0% (w/w) Tween 20®, 0,5% (w/w) BSA, 2,5 µL Konjugat) ist eine sehr deutliche Testlinie auch bei einer Nullprobe zu erkennen (oberer Streifen). Nach rechts hin nimmt die Nullprobenintensität deutlich ab, aber auch die Sensitivität der Streifen verringert sich. So kann im mittleren Bild (0,5% (w/w) Tween 20®, 1,5% (w/w) BSA; 2,5 µL Konjugat) nur noch eine Konzentration von 5 ng/mL SEB eindeutig von niedrigeren Konzentrationen unterschieden werden, im rechten Bild (1% (w/w) Tween 20®, 1% (w/w) BSA; 2,5 µL Konjugat) sogar nur noch eine Konzentration von 7,5 ng/mL.

Die Versuche zur Optimierung der Nullprobenintensität mussten nach dem 18. Versuch abgebrochen werden, da eine deutliche Flokkulation des eingesetzten Antikörper-Gold-Konjugates auftrat. Diese konnte auch durch Behandlung des Konjugates im Ultraschallbad nicht aufgelöst werden. Eine Fortführung der Optimierungsversuche hätte möglicherweise noch weitere Erkenntnisse gebracht. Zurückzuführen ist die Flokkulation vermutlich auf mikrobiellen Bewuchs der Konjugat-Lösung.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der Simplex-Algorithmus durchaus auch bei der Entwicklung von LFD-Tests zur Optimierung der Testkomponenten eingesetzt werden kann, auch wenn mit den zur Verfügung stehenden Materialien kein optimales Ergebnis erzielt werden konnte. Da inzwischen jedoch auch ein robustes Herstellungsprotokoll für die Antikörper-Gold-Konjugate entwickelt worden ist, werden die Versuche nun mit selbst hergestelltem

Konjugat fortgesetzt.

6.3.4 Versuche mit selbst hergestelltem Antikörper-Gold-Konjugat

Versuche mit selbst hergestelltem Konjugat

Nachdem ein robustes Protokoll zur Konjugation von Antikörpern und kolloiden Gold-Partikeln erstellt und optimiert werden konnte, soll diese nun auch für die Entwicklung des SEB-Schnelltests herangezogen werden. Die Konjugation erfolgt dabei weitgehend nach den in Kap. 1 beschriebenen Protokollen. Lediglich die Stamm-lösung des zu konjugierenden Antikörpers wird nach Herstellerangaben vorbereitet. Die hergestellten Konjugate sollen im weiteren Verlauf in dem beschriebenen Testaufbau zum Einsatz kommen. Die Durchführung der Tests soll unter Standardbedingungen erfolgen.

Zunächst kann auch in Wiederholungsversuchen im interessierenden SEB-Konzentrationsbereich zwischen 0-10 ng/mL kein SEB in den untersuchten Proben nachgewiesen werden. Zwar verfärbt sich die auf diesen Streifen ebenfalls aufgetragene Kontrolllinie (1 mg/mL anti-Maus_{Kaninchen}, gebrauchsfertige Lösung von Alchemy Laboratories) deutlich, die Testlinie jedoch bleibt bei allen untersuchten SEB-Konzentrationen farblos. Erst

eine Aufweitung des untersuchten Konzentrationsbereichs bis auf 10.000 ng/mL SEB erbringt positive Befunde auf den Teststreifen (Abb. 46). Zwischen 250-5.000 ng/mL sind vergleichsweise schwache Testsignale zu er-

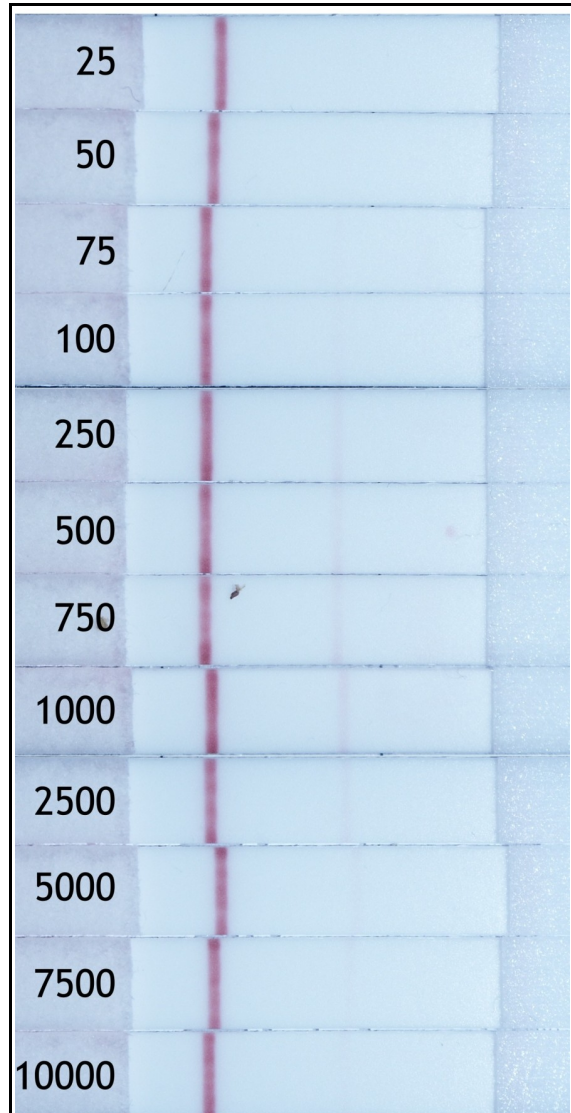
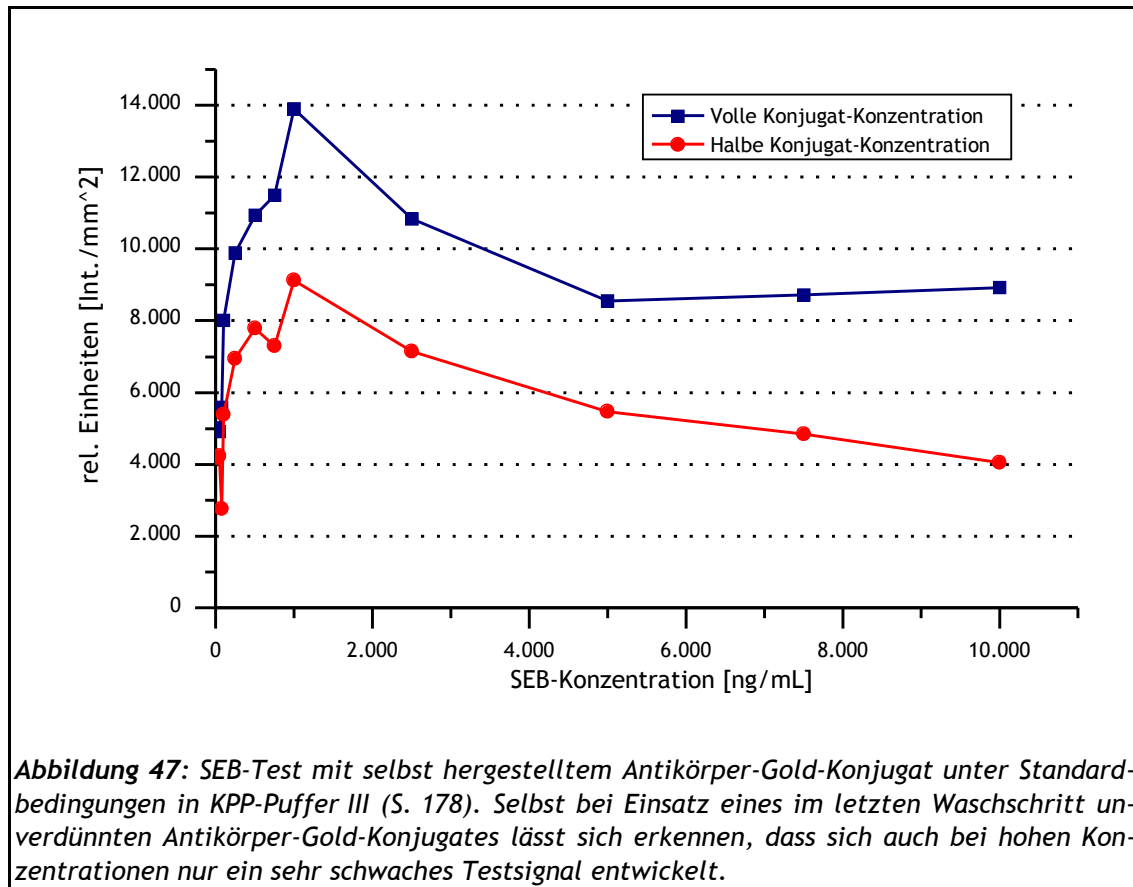


Abbildung 46: Foto einer SEB-Konzentrationsreihe mit selbst hergestelltem Antikörper-Gold-Konjugat. Die Zahlen geben die Konzentration in ng/mL an. Neben der deutlichen Kontrolllinie (links) ist zwischen 250-5.000 ng/mL eine sehr schwache Testlinie zu erkennen.

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

kennen, die bei einer weiteren Erhöhung der SEB-Konzentration wieder deutlich abnehmen. Wie in einer weiteren Darstellung deutlich wird (Abb. 47), erbringt auch eine Variation der Konjugat-Konzentration (verschiedene Verdünnungen nach dem letzten Waschschrift) kein besseres Ergebnis.



Vermutlich wegen der starken Lichtstreuung der hochkonzentrierten Konjugat-Suspensionen ist es mit den zur Verfügung stehenden Photometern nicht möglich, eine absolute Konzentration der Antikörper-Gold-Konjugate zu ermitteln. Verdünnungsversuche mit hergestellten Konjugat und Pufferlösung erbringen mit den verwendeten Geräten keinen gesicherten Zusammenhang zwischen OD und Konjugat-Konzentration. Daher werden hier und im folgenden die Konjugat-Konzentrationen im Verhältnis zur Endkonzentration des Konjugates nach dem letzten Waschschrift betrachtet.

Der erhebliche Sensitivitätsverlust des SEB-Tests mit selbst hergestelltem Konjugat gegenüber dem im Auftrag außer Haus hergestellten Reagenz wird in mehreren Wiederholungsversuchen bestätigt, obwohl sämtliche eingesetzten Materialien (Pads, Membranen, Konjugat-Antikörper, Fängerantikörper, Pufferlösungen, Toxin) ausgetauscht bzw. erneuert werden.

Alle durchgeführten Untersuchungen deuten auf die Konjugationsbedingungen als Ursache für den Sensitivitätsverlust hin, obwohl eine Konjugation von anti-SEB_{Maus} S643 an die Gold-Partikel grundsätzlich funktioniert haben muss, da auf den verwendeten Teststreifen andernfalls keine derart ausgeprägte Kontrolllinien zu erkennen gewesen wären. Es kann davon ausgegangen werden, dass die als Kontrolllinie immobilisierten anti-Maus_{Kaninchen} die an die Gold-Partikel konjugierten anti-SEB_{Maus} S643 binden und somit das Kontrollsignal verursachen. Es könnten jedoch die Konjugationsbedingungen einen mindernden Einfluss auf die Qualität des fertigen Konjugates hinsichtlich der Reaktivität und SEB-Sensitivität der Konjugat-Antikörper haben.

Optimierung der Antikörper-Gold-Konjugation

Die Konjugationsbedingungen werden zunächst nach den in Kap. 1.1 erläuterten Verfahren untersucht, jedoch werden in Bezug auf die zur Stabilisierung notwendige MAb-Konzentration und den optimalen pH-Wert des Adsorptionspuffers keine neuen Erkenntnisse gewonnen. Vielmehr gleichen die Ergebnisse den bereits in Kap. 1.1 beschriebenen (Abb. 48). Es kommt zu vereinzelt Agglomeraten von wenigen Partikeln, jedoch bleiben in den betrachteten Proben größere Zusammenballungen aus.

Um trotz dieser Ergebnisse ausschließen zu können, dass der pH-Wert des Adsorptionspuffers einen Einfluss auf die Reaktivität bzw. SEB-Sensitivität der Konjugat-Antikörper hat, werden anti-SEB_{Maus}-Konjugate bei pH-Werten von pH 6,5, pH 7 und pH 9,2 hergestellt und nach den beschriebenen Verfahren mit Teststreifen untersucht. Dabei wird neben dem pH-Wert des Adsorptionspuffers II (S. 176) auch die Konzentration des Antikörper-Gold-Konjugates variiert.

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

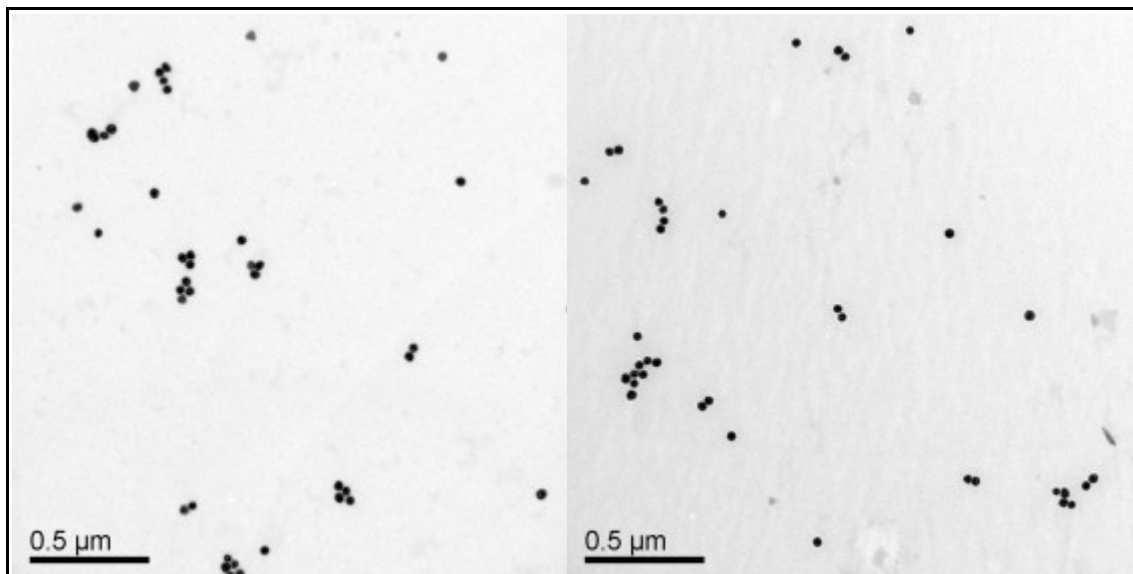


Abbildung 48: TEM-Aufnahmen bei den pH-Werten pH 6,5 (links) und pH 9,2 (rechts). Zwischen den Aufnahmen ist kein Unterschied bzgl. einer verstärkten Agglomeration bei einem bestimmten pH-Wert zu erkennen. Die Bilder wurden mit dem bereits beschriebenen TEM angefertigt.

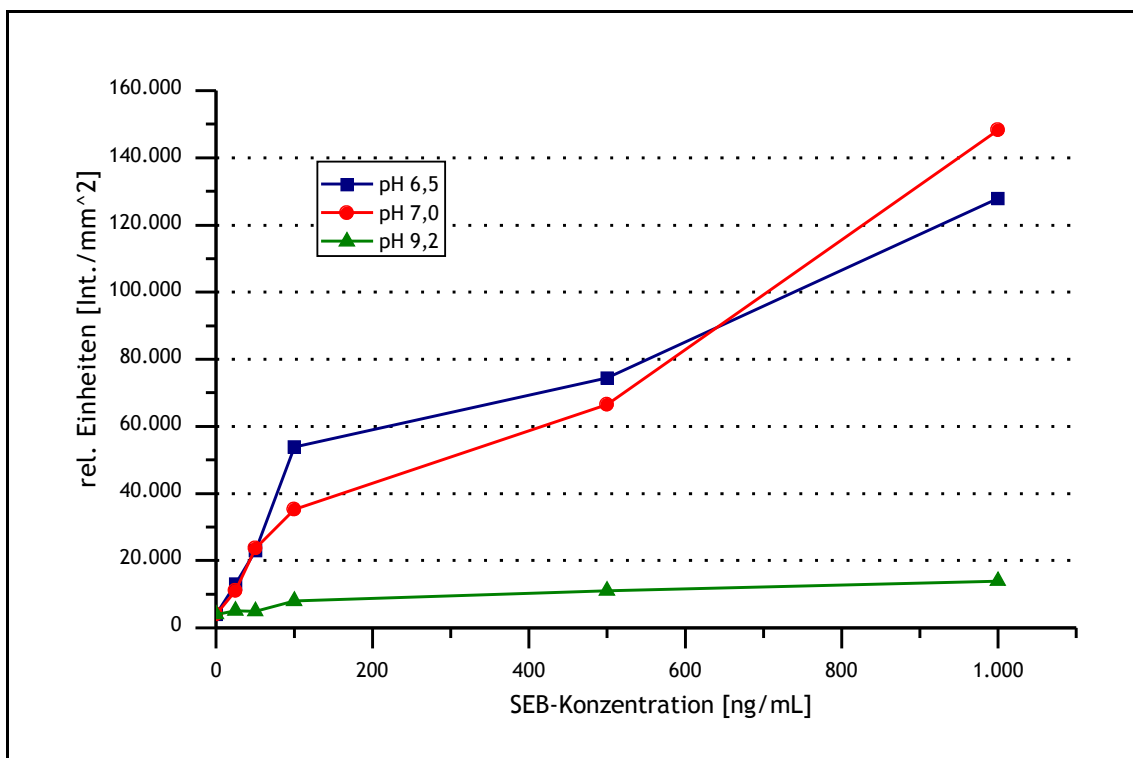


Abbildung 49: Der Unterschied der Intensitätsverläufe in einem ausgesuchten SEB-Konzentrationsbereich mit Antikörper-Gold-Konjugaten, die bei pH-Werten von pH 6,5-9,2 hergestellt wurden, ist deutlich erkennbar.

Bei den Versuchen wird festgestellt, dass der pH-Wert des Adsorptionspuffers offensichtlich doch einen ganz erheblichen Einfluss auf die Sensitivität des fertigen Testsystems hat (Abb. 49). Deutlich ist in Abb. 49 erkennbar, dass mit abnehmendem pH-Wert des Adsorptionspuffers die SEB-Sensitivität der Teststreifen zunimmt. Gute Ergebnisse können bei pH-Werten von pH 6,5 und pH 7 erreicht werden. In diesem pH-Bereich kann die Sensitivität reproduzierbar bis auf 25 ng/mL gesteigert werden. In einzelnen Versuchen können leichte Verfärbungen der Testlinien auch bei Konzentrationen bis zu 10 ng/mL nachgewiesen werden. Bei dem in den Vorversuchen (Kap. 1.1) ermittelten pH-Wert von pH 9,2 zeigen sich in diesen Untersuchungen die schlechtesten Ergebnisse. SEB ist mit den bei pH 9,2 hergestellten Antikörper-Gold-Konjugaten visuell nahezu nicht nachweisbar (s.a. Abb. 46).

Mit großer Wahrscheinlichkeit schadet ein hoher pH-Wert bei der Konjugation dem Konjugat-Antikörper. Möglicherweise werden die MAb, die ihre optimale Wirkung im neutralen pH-Bereich entfalten, durch die relativ aggressiven Bedingungen während der Konjugation und dem anschließenden Waschen zumindest partiell denaturiert.

Eine andere Deutung der erhaltenen Ergebnisse beruht darauf, dass Reste des auf dem Conjugate Pad eingetrockneten Adsorptionspuffers die erste Antikörper-Antigen-Reaktion des SEB-Tests behindert und damit die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen teilweise unterbindet.

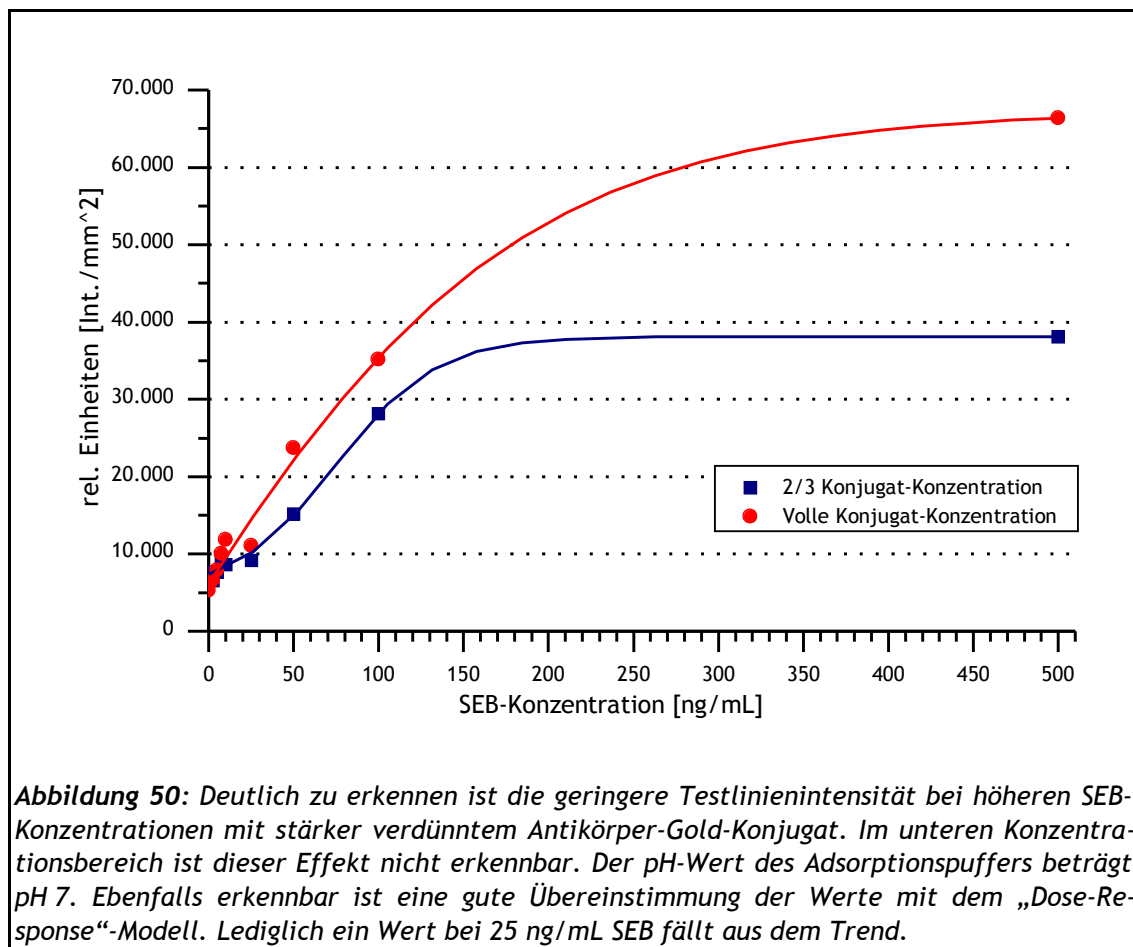
Genauere Charakterisierung verschiedener Herstellungsbedingungen für anti-SEB-Konjugate

Um genauere Erkenntnisse über das Testverhalten mit bei geringeren pH-Werten hergestellten Konjugaten zu erhalten, werden weitere Versuchsreihen durchgeführt. So wird beispielsweise das Verdünnungsverhältnis des Konjugates untersucht.

Während das Verdünnungsverhältnis des zur Testdurchführung verwendeten Konjugates bei pH 9,2 kaum Effekte zeigt, hat dieses bei pH 6,5 und pH 7,0 einen deutlicher erkennbaren Einfluss auf den Intensitätsverlauf. Als Beispiel dafür ist in Abb. 50 der Verlauf für Konjugate mit voller Konzentration bzw. 2/3-Konzentration dargestellt, die bei pH 7 hergestellt wurden.

Neben diesen Untersuchungen sollen auch die Grenzen des entwickelten Systems ausgelotet werden. Während bei geringen SEB-Konzentrationen eine Nachweisgrenze von 10-25 ng/mL festgelegt werden kann, zeigen Untersu-

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern



chungen im oberen Konzentrationsbereich, dass SEB-Konzentrationen bis zu 25.000 ng/mL SEB (= 25 µg/mL) eindeutig nachgewiesen werden können. Zwar ist bei der digitalen Auswertung bereits ab einer SEB-Konzentration von 5 µg/mL ein deutlicher Abfall der Signalintensität zu erkennen (Abb. 51), bei der visuellen Auswertung der Teststreifen ist der Intensitätsabfall jedoch erst außerhalb des grün markierten Bereichs ab ca. 25 µg/mL relevant. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch den Farbeindruck auf den zugehörigen Digitalfotos (Abb 52).

Oberhalb von 25 µg/mL SEB nimmt die Intensität der Testlinien sehr stark ab und verringert sich bis 100 µg/mL SEB deutlich. Von einem SEB-Nachweis in diesem Konzentrationsbereich ist nach den bisher erhaltenen Ergebnissen abzuraten, um Fehler bei der Interpretation der Testsignale zu vermeiden. Das hier beobachtete Phänomen wurde bereits in Kap. 6.2 beschrieben und ist hier eindeutig auf eine Absättigung aller freien Bindungsstellen sowohl an den markierten MAb als auch an den immobilisierten MAb zurückzuführen, was letztendlich die Bildung des erforderlichen Sandwich-Komplexes verhindert.

6.3 Versuche mit monoklonalen Antikörpern

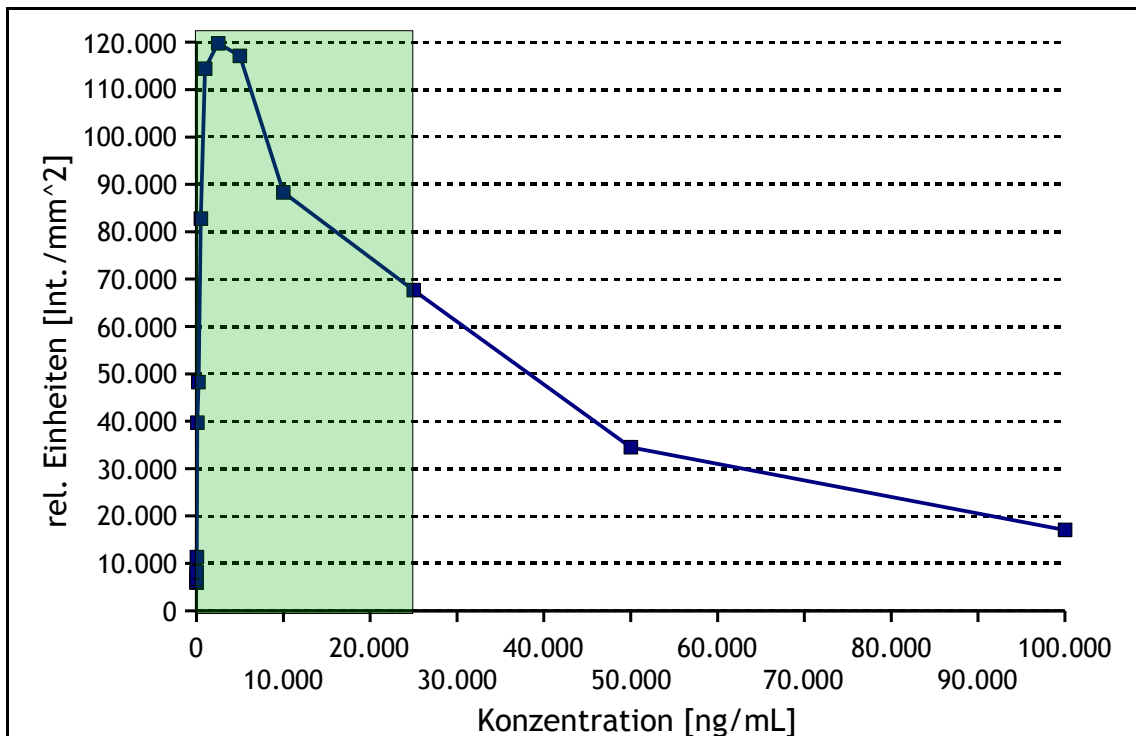


Abbildung 51: Ein Versuch mit hohen SEB-Konzentrationen zeigt den abgebildeten Verlauf von 0-100.000 ng/mL. Das verwendete Antikörper-Gold-Konjugat wurde bei pH 7 hergestellt und auf 2/3 der Konzentration verdünnt.

Zwar liegt die mit dem entwickelten Testsystem erreichte Nachweisgrenze immer noch erheblich über der mit dem außer Haus hergestellten Reagenz erzielten Grenze, allerdings bleiben in den Testreihen mit selbst hergestelltem Konjugat die bisher auftretenden Falsch-positiv-Signale bei Nullproben aus. Diese Tatsache ist auf jeden Fall als wichtiger zu bewerten als eine geringe Nachweisgrenze, auch wenn an dieser Stelle Optimierungen anzustreben sind.

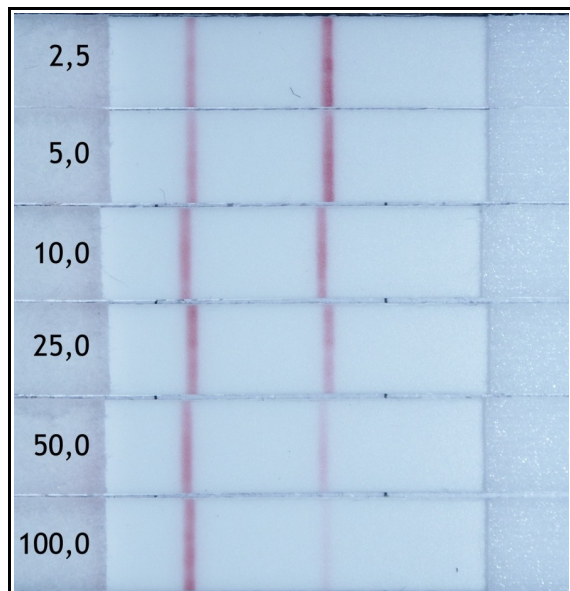


Abbildung 52: Foto von Teststreifen aus dem höheren untersuchten SEB-Konzentrationsbereich. Ab 25 µg/mL nimmt die Testlinienintensität auch sichtbar ab.

6.4 Fazit und Ausblick

Während der gesamten Arbeiten an dem SEB-Schnelltestsystem mussten erhebliche Herausforderungen hinsichtlich des zur Verfügung stehenden Materials bewältigt werden. Vor allem finanzielle Gründe erforderten ein hohes Maß an Flexibilität und Einschränkungen hinsichtlich der Versuchsplanung. Membran- und Vliesmaterialien standen ebenso wie Antikörper, Toxin und kolloide Goldlösung nur in begrenztem Umfang zur Verfügung, was die vollständige systematische Erschließung des gesamten Themengebietes verhinderte. Dennoch konnte letztendlich vollständig mit eigenen Mitteln ein funktionierendes Testsystem für SEB in wässrigen Pufferlösungen entwickelt und getestet werden.

Das Schnelltestsystem funktioniert nach den angegebenen Herstellungsprotokollen und Durchführungsvorschriften (Anhang, Kap. 1.2) reproduzierbar in einem Bereich von 25 ng/mL bis 10.000 bzw. 25.000 ng/mL SEB. Das Toxin konnte in allen Proben innerhalb dieses Bereiches einwandfrei nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprechen hinsichtlich des Intensitätsverlaufes der Testlinien dem im Theoretischen Teil beschriebenen Bild für Sandwich-Assays.

Es wäre wünschenswert, die Arbeiten an dem Testsystem fortzusetzen, um die Ergebnisse vor allem hinsichtlich der Sensitivität des Tests zu optimieren. Mit den verwendeten Materialien sollte es durchaus möglich sein, SEB-Konzentrationen im kleinen ppb-Bereich bzw. sogar im ppt-Bereich zu detektieren.

Die Untersuchung realer Proben (Nahrungsmittel, Stuhl, Erdreich etc.) mit dem entwickelten Testsystem steht noch aus. Gerade Erkenntnisse aus solchen Versuchen sind aber eine wichtige Voraussetzung für einen kommerziell verwertbaren, standardmäßigen Einsatz eines SEB-Schnelltests. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bieten für derartige Bemühungen eine solide, erfolversprechende Basis.

Durchaus erfolgreich gestaltete sich die Verwendung des Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Testkomponenten. Es wäre sicherlich interessant, umfangreichere Versuchsreihen mit Hilfe dieses Werkzeuges zu realisieren. So ließen sich auch weitere Faktoren in den Simplex einbinden. pH-Wert und Pufferkonzentration wären dafür nur zwei Beispiele. Neben BSA und Tween 20® könnten die Auswirkungen weiterer Detergenzien wie Triton® oder verschiedener Polyethylenglykole (PEG) untersucht werden. Denkbar wäre auch die Verwendung anderer Algorithmen und ein Vergleich der Methoden

anhand der Schnelltestentwicklung.

Während der Testentwicklung wurden auch eigentlich nicht für LFD-Anwendungen konzipierte Membranmaterialien untersucht und teilweise erfolgreich in Schnellteststreifen integriert. Gerade wenn bei den eingesetzten Antikörpern längere Reaktionszeiten vonnöten sein sollten, bietet sich der Einsatz feinerporiger Membranen an. Zwar liegt das Hauptaugenmerk der Testentwicklung derzeit auf immer schnelleren Tests und immer kürzeren Reaktionszeiten, jedoch ließen sich durch die feinerporigen Membranen vielleicht auch noch eine große Zahl an Antikörpern und Antigenen für LFD-Tests erschließen, die bisher aufgrund langer Reaktionszeiten für eine Nutzung nicht in Frage kommen. Es wäre durchaus interessant, entsprechende Studien im Bereich der Membranherstellung zu unternehmen und zu untersuchen, inwieweit die Herstellung feinerporiger Membranmaterialien für LFD-Anwendungen möglich ist.

7. Schnelltest für Microcystin-LR

7.1 Vorüberlegungen

Bereits im Theoretischen Teil dieser Arbeit wurden Struktur und Größe der Microcystine ausführlich beschrieben. Außerdem wurde erläutert, dass bei derart kleinen Analytmolekülen vor allem aus sterischen Gründen das kompetitive Testformat zum Einsatz kommen muss, da eine Bindung zweier Antikörper an das Analytmolekül wie beim Sandwich-Format nicht möglich ist. Für den vorliegenden Fall des MC-LR-Schnelltests bedeutet dieses den Vorteil, dass nur ein geeigneter spezifischer Antikörper für den Test gefunden werden muss. Dieser muss dann wie beschrieben an entsprechende Markierungsreagenzien (hier wiederum Gold-Partikel) gebunden werden.

Gleichzeitig bringt die geringe Molekülgröße des MC-LR im Vergleich zum SEB aber den Nachteil, dass sich das Algentoxin als Fängerreagenz nicht direkt auf CN-Membranstreifen immobilisieren lässt. Außerdem würde eine derartige Immobilisierung auch zu einer Blockierung der Epitope des MC-LR führen, die für die Antigen-Antikörper-Bindung notwendig sind. Es muss folglich eine andere Möglichkeit gefunden werden, MC-LR auf CN-Membranen zu binden. Im Allgemeinen werden in einem solchen Fall die kleineren Analytmoleküle an größere Moleküle, wie z.B. BSA, gekoppelt [Henderson, 2000]. Auch im vorliegenden Fall soll auf diese Weise vorgegangen werden.

7.2 Entwicklung eines Standard-Testsystems

7.2.1 Herstellung des anti-MC-LR-Konjugates

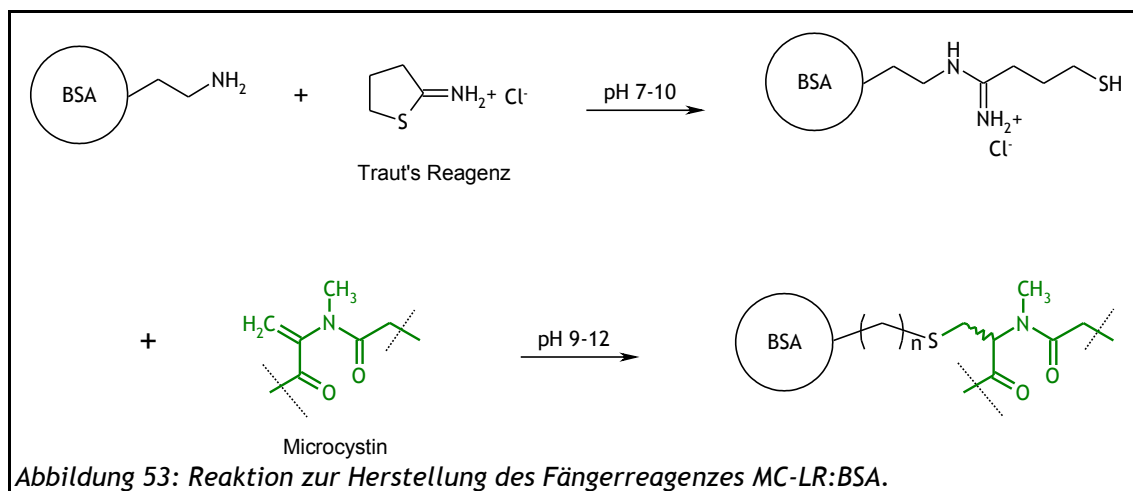
Anders als bei der Entwicklung des SEB-Schnelltests muss bei der Entwicklung des MC-LR-LFD nicht zunächst auf kommerziell hergestellte Antikörper-Gold-Konjugate zurückgegriffen werden, sondern dank der zum Entwicklungsbeginn abgeschlossenen entsprechenden Vorarbeiten kann der Aufbau des Testsystems direkt mit der Herstellung eines anti-MC-LR-Gold-Konjugates begonnen werden. Dabei werden die in den Modellversuchen erhaltenen Ergebnisse zugrunde gelegt. Die Herstellung des Konjugates erfolgt weitgehend unter den in Kap. 1 beschriebenen Bedingungen. Es wird 1 mL des Gold-Kolloids EM.GC 40 in einem Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und mit 150 μ L einer Antikörperlösung in Adsorptionspuffer II (S. 176) versetzt, um eine Gesamtkonzentration von 4,35 μ g/mL anti-MC-LR zu erreichen. Die Reaktionsmischung wird

ausgiebig durchmischt und für 45 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt die Aufreinigung des Konjugates durch Zentrifugation und Waschen mit Lagerungspuffer III (S. 180). Die Anzahl der Waschschr tte wird dabei von der Beschaffenheit des Konjugat-Pellets abhängig gemacht. Lässt sich das Pellet auch im Ultraschall-Bad nicht wieder problemlos resolvatisieren, wird die Aufreinigung des Konjugates nach dem folgenden Waschschr tt abgebrochen. Im Allgemeinen werden nach dieser Vorschrift fünf Waschschr tte durchgeführt. Es folgt abschließend eine Verdünnung des Pellets auf zunächst 50 μL Gesamtvolumen. Die Lösung kann so verdünnt zur Anwendung kommen oder je nach Verwendung mit Lagerungspuffer III weiter verdünnt werden.

7.2.2 Herstellung des Fängerreagenzes

Grundlagen

Wie bereits in Kap. 7.2.1 beschrieben wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper schon in [Zeck, 2001] ein kompetitiver MC-LR-ELISA entwickelt. Zeck verwendete an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes MC-LR als Tracer-Reagenz für den ELISA. Die Peroxidase dient im ELISA zur Oxidation eines später dazugegebenen Nachweisreagenzes. Diese Funktion ist im vorliegenden Fall nicht erforderlich, da hier zum eigentlichen Nachweis von MC-LR das entsprechende Antikörper-Gold-Konjugat zum Einsatz kommt. Das in der beschriebenen Literaturstelle entwickelte Herstellungsprotokoll soll allerdings als Grundlage für das in der vorliegenden Arbeit herzustellende Fängerreagenz dienen, das als Testlinie auf die Membranstreifen appliziert wird. Anstelle der Peroxidase soll BSA als Kopplungspartner eingesetzt werden.



Die Kopplung zwischen MC-LR und Protein erfolgt mit Hilfe von Traut's-Reagenz (2-Iminoethanol Hydrochlorid), das zum einen die kovalente Bindung zwischen Lysin-Gruppen des BSA und dem Dehydroalanin-Teil (grün in Abb. 12) des Microcystins ausbildet und zum anderen gleichzeitig eine C-Kette als Spacer zwischen dem großen Proteinmolekül BSA und dem Hapten MC-LR einfügt.

Wie in Abb. 53 zu sehen ist, wird das eingesetzte BSA zunächst an einem Teil seiner zugänglichen Lysin-Gruppen zum Thiol umgewandelt. Diese Modifizierung des BSA erfolgt bei leicht alkalischem pH-Wert (pH 8) und sollte unter Schutzgas durchgeführt werden, um eine Oxidation der entstehenden Thiole zu verhindern. Das SH-modifizierte Protein muss zügig gereinigt werden, um eine Reaktion überschüssigen Traut's Reagenz mit MC-LR zu verhindern.

Danach wird MC-LR zugegeben und bindet durch nukleophile Addition des Thiols an die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe des MC-LR. Auf diese Weise sollte ein zur Bindung an CN-Membranen ausreichend großes Molekül entstehen, das das für den kompetitiven Testaufbau notwendige Epitop zur Verfügung stellt.

Praktische Herstellung des Fängerreagenzes

BSA wird in Triethanolaminpuffer (S. 180) gelöst und die Lösung im Reaktionsgefäß mit gasförmigem Stickstoff durchspült und überschichtet, um Nebenreaktionen bzw. einen Zerfall des sich bildenden Thiols zu vermeiden. Eine Lösung von Traut's-Reagenz in Wasser wird tropfenweise zugegeben und die Lösung wird kurze Zeit bei RT gerührt. Danach wird weitere Traut's-Reagenz-Lösung zugegeben und für längere Zeit bei RT gerührt. Die Reinigung der so SH-modifizierten Peroxidase erfolgt gelchromatographisch an Sephadex PD-10, G-25-Säulen mit PBS-Puffer (S. 180), wobei die einzelnen Fraktionen in einer Mikrotiterplatte aufgefangen werden. Die Fraktionen werden in einem Photometer für Mikrotiterplatten (Multiskan Spectrum, Thermo Labsystems) bei 280 nm (typisches Absorptionsmaximum von Proteinen) untersucht und die anhand ihrer Absorption erkennbaren BSA-haltigen Fraktionen vereinigt und sofort mit Stickstoffgas überschichtet.

MC-LR wird in einer Acetonitril/DMSO-Lösung (9% (v/v) DMSO in Acetonitril) gelöst und diese Lösung zu der Lösung mit modifiziertem BSA gegeben. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird mit Boratpuffer (S. 177) auf pH 8 eingestellt. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt. Das Fängerreagenz MC-

LR:BSA wird unter Stickstoff durch dreimalige Gelchromatographie über Sephadex PD-10 (G-25) mit PBS-Puffer gereinigt. Die MC-LR:BSA-haltigen Fraktionen werden erneut photometrisch ermittelt (dieses Mal mit einer Doppelbestimmung bei 280 nm (s.o.) und 238 nm (Absorptionsmaximum von MC-LR)) und vereinigt. Die Konzentrationsbestimmung an MC-LR:BSA in dieser Lösung erfolgt über einen BCA-Test (s.a. Anhang 1.5). Bei den durchgeführten Koppelungsversuchen wurden MC-LR:BSA-Konzentrationen von etwa 2 mg/mL erhalten. Anhand der Ergebnisse aus dem Mikro-BCA-Test wurde das gelöste MC-LR:BSA portioniert und in der verbliebenen Pufferlösung bei -20 °C eingefroren bzw. zunächst lyophilisiert und dann bei -20 °C gelagert.

7.2.3 Untersuchung der hergestellten Einzelkomponenten

Tropftests als Vorversuche

Bereits in Kap. 6.1 wurde die Durchführung von Tropftests zur Voruntersuchung der immunchemischen Testkomponenten beschrieben. Analog zu den dort beschriebenen Tests werden auch für den MC-LR-Test Tropftests durchgeführt.

Dazu wird zunächst die eingefrorene MC-LR:BSA-Lösung aufgetaut und ein definiertes Volumen davon 1:1 mit Applikationspuffer II (S. 176) verdünnt. Es werden einmal 50 µL der unverdünnten MC-LR:BSA-Lösung und zweimal 50 µL der verdünnten MC-LR:BSA-Lösung auf insgesamt drei 13 mm-Stanzlinge handelsüblicher Diagnostikmembranen (Sartorius Unisart CN 140) getropft. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT und einer anschließenden Trocknung über 30 min bei 40 °C werden die Proben einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II (50 mmol, pH 6,9, S. 178) gewaschen, um ungebundenes MC-LR:BSA abzuwaschen. Die noch feuchten Stanzlinge werden mit einer BSA-Lösung (10 mg/mL) bedeckt, um freie Bindungsplätze auf der CN-Membran abzusättigen. Nach einem Trocknungsschritt (30 min, 40 °C) werden die Stanzlinge erneut einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II gewaschen.

Das MC-LR wird in KPP-Puffer V (S. 179) gelöst und mit diesem Puffer auf eine Konzentration von 10 µg/mL verdünnt. 50 µL dieser Toxinlösung werden auf einen der mit verdünnter MC-LR:BSA-Lösung behandelten Stanzlinge aufgetragen. Die anderen Stanzlinge bleiben als Negativ-Probe unbehandelt. Die so behandelten Stanzlinge werden erneut für 2 h bei RT inkubiert und danach einzeln in Einweg-Petrischalen dreimal mit jeweils 3 mL KPP-Puffer II gewa-

schen.

Alle Stanzlinge werden nun mit 50 μ L einer Antikörper-Gold-Konjugat-Suspension (5 μ L Konjugat mit KPP-Puffer V verdünnt) überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Danach erfolgen erneut drei Waschschritte mit je 3 mL KPP-Puffer II.

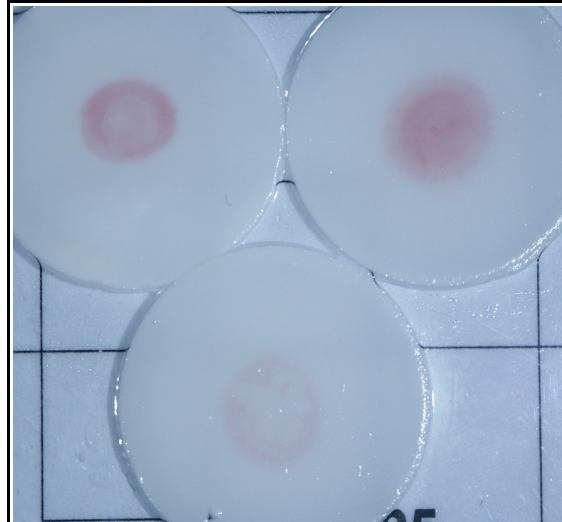


Abbildung 54: Tropftest zur Entwicklung des MC-LR-Tests auf Membranstanzlingen. Oben links: Nullprobe auf verdünntem MC-LR:BSA-Reagenz; oben rechts: Nullprobe auf unverdünntem MC-LR:BSA-Reagenz; unten: Toxin behandelte Probe.

Nach den Waschschritten kann bereits per Augenschein festgestellt werden, dass alle Membranproben eine blassrote Färbung aufweisen (Abb. 54), die auf nicht ausgewaschenes Antikörper-Gold-Konjugat zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den Nullproben lässt sich bei der toxinhaltigen Probe die rötliche Färbung allerdings mit aus einer Mikroliterpipette direkt aufgetragenen Puffer abwaschen (Abb. 54, unten). Bei den beiden Nullproben tritt diese Entfärbung auch nach mehrfachen direkten Pufferspritzern aus der Mikroliterpipette nicht auf. Stattdessen zeigen sich relativ deutlich umgrenzte rote kreisförmige Verfärbungen (Abb. 54, obere Reihe) wie es bei einer Nullprobe eines kompetitiven LFD-Tests zu erwarten ist. Dabei unterscheiden sich die beiden Nullproben trotz unterschiedlicher Konzentration des Fängerreagenzes MC-LR:BSA nur marginal.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Konjugation des anti-MC-LR_{Maus} an die Gold-Partikel als auch die Kopplung von MC-LR an BSA mit gutem Erfolg funktioniert haben. Die bleiben-

de Verfärbung auf den nicht mit Toxin behandelten Stanzlingen weist auf eine immunchemische Reaktion zwischen dem anti-MC-LR-Gold-Konjugat und dem MC-LR:BSA hin, während die abwaschbare Verfärbung des mit Toxin behandelten Stanzlings zeigt, dass das zuvor aufgetragene MC-LR überwiegend die Bindungsstellen der Konjugat-Antikörper besetzt hat und diese somit nicht mehr für eine Bindung an das MC-LR:BSA zur Verfügung stehen.

Eine Anwendung der hergestellten Einzelkomponenten in einem LFD-Test sollte folglich auch möglich sein.

Versuche mit LFD-Schnelltests

Aus den an dieser Stelle ermittelten Daten und den Ergebnissen aus den Vorversuchen wird ein Herstellungsprotokoll für MC-LR-Schnelltests abgeleitet:

Das Antikörper-Gold-Konjugat wird wie in Kap. 7.2.1 beschrieben hergestellt und das endgültige Konjugat 1:1 mit Lagerungspuffer III (S. 180) verdünnt. Es steht danach für die weitere Verwendung zur Verfügung.

Das hergestellte Fängerreagenz wird aufgetaut und ein Teil davon auf eine MC-LR:BSA-Konzentration von 1 mg/mL mit Applikationspuffer II (S. 176) verdünnt. Der Rest wird unverdünnt weiterverwendet. Unter Standardbedingungen (Kap. 2) werden beide Lösungen mit dem BioJet Quanti linienförmig auf Streifen einer CN 140 Diagnostikmembran aufgetragen. Die weitere Vorbereitung der Teststreifen erfolgt wie in Kap. 2 beschrieben unter Standardbedingungen.

In einer Mikrotiterplatte werden Verdünnungsreihen von MC-LR in 200 µL KPP-Puffer V (S. 179) in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 ng/mL MC-LR vorbereitet und die Teststreifen in die Lösungen gestellt. Die Teststreifen werden nach 15 min fotografiert und zunächst visuell ausgewertet. Die digitalen Aufnahmen sind in Abb. 55 dargestellt.

Deutlich erkennbar ist in Abb. 55 bei den Streifen, auf die die höher konzentrierte MC-LR:BSA-Lösung aufgetragen wurde (links), der starke „Autobahneffekt“ bei geringeren MC-LR-Konzentrationen und die weißliche Färbung der Testlinien bei höheren MC-LR-Konzentrationen im gewählten Bereich. Beide Effekte wurden auch schon bei der Entwicklung des SEB-Tests beobachtet und sind auf eine ungleichmäßige Benetzung des Testlinienbereichs durch die Probenlösung zurückzuführen. Im linken Bild ist die Linienintensität zwar insgesamt schwächer, dafür zeigt sich aber bereits eine nahezu einheitliche Ver-

ringung des Testsignals mit steigender Analyt-Konzentration.

Ausschlaggebend für den „Autobahneffekt“ kann in diesem Fall die erhebliche Proteinmenge sein, die auf diese Teststreifen pro Flächeneinheit der Membran aufgetragen wurde (unverdünnte MC-LR:BSA-Lösung mit einem Proteingehalt von 2 mg/mL). Sie kann zu einem schlecht vorhersagbaren Probenfluss durch den Testlinienbereich führen. Dieses kann sowohl zu Ungleichmäßigkeiten in der Färbung der Testlinie führen als auch dazu, dass die Testlinie von der Probenflüssigkeit im Inneren der Membran in einer Tiefe „unterlaufen“ wird, in der ein möglicherweise entstehendes Testsignal nicht mehr visuell detektiert werden kann (Tiefe > ca. 10 µm, gemessen von der Membranoberfläche [Millipore, 1998]). Die Linie bleibt dann unsichtbar.

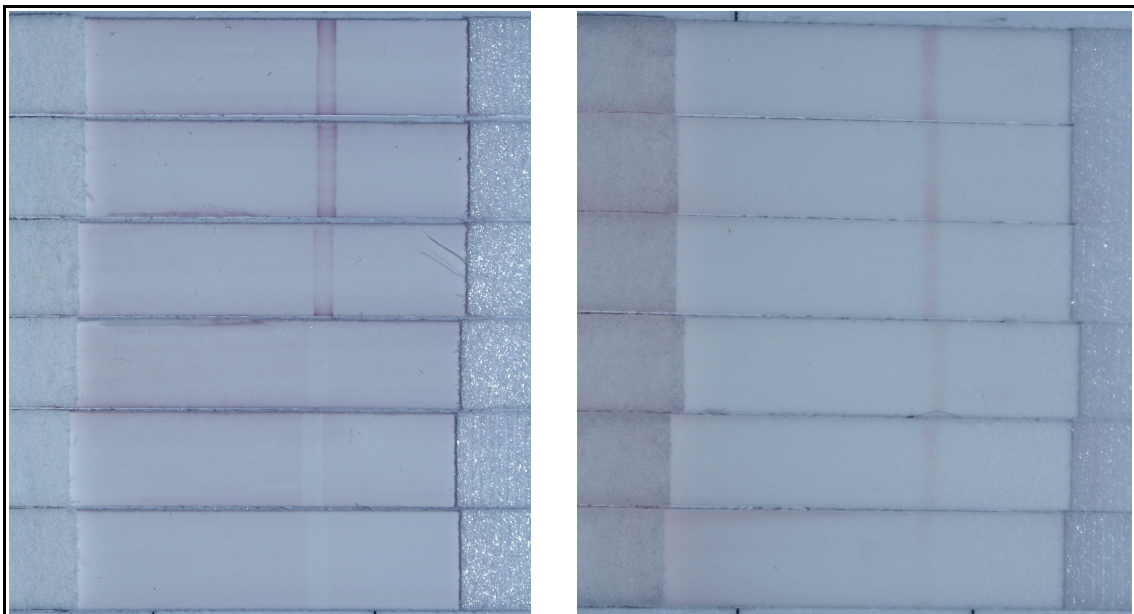
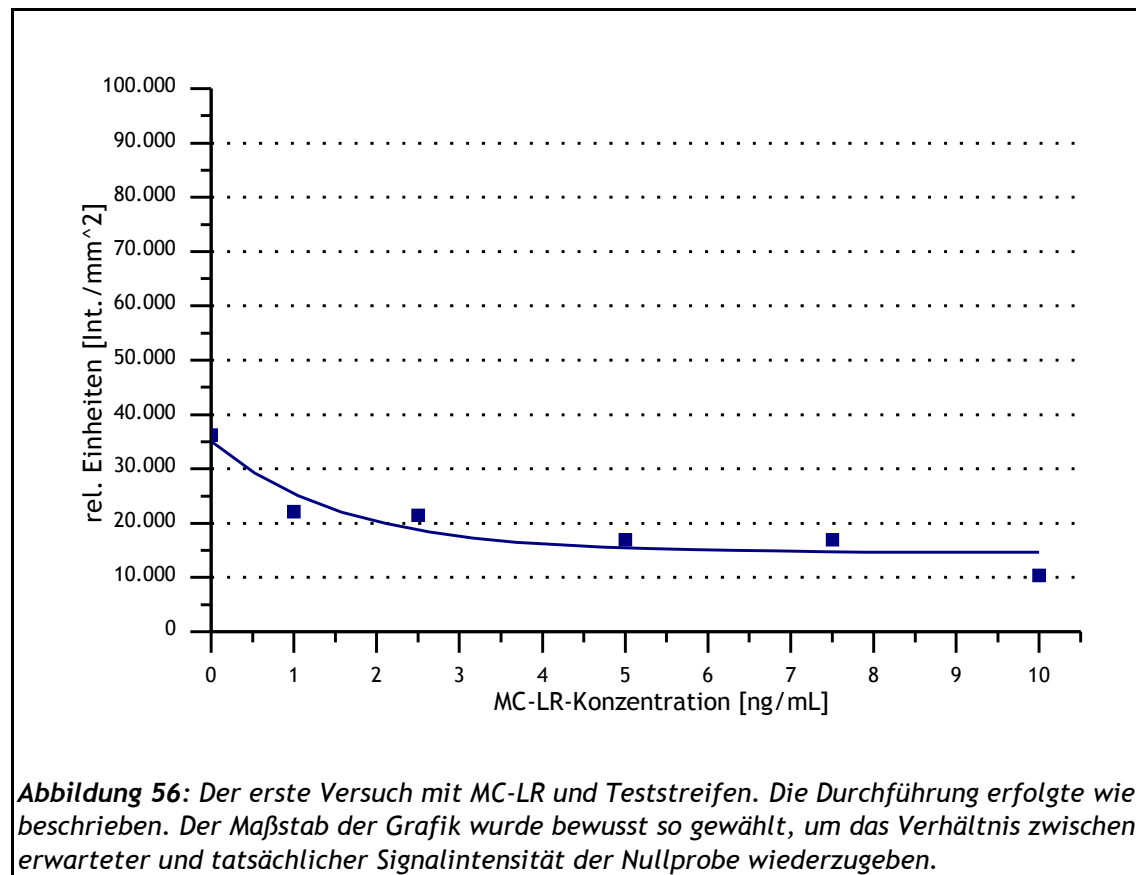


Abbildung 55: Erste Versuche mit dem MC-LR-Schnelltest in einem MC-LR-Konzentrationsbereich von 0 bis 10 ng/mL (Abstufungen von oben: 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 ng/mL). Links: Testlinie mit 2 mg/mL MC-LR:BSA, rechts: Testlinie mit 1 mg/mL MC-LR:BSA.

Es ist bisher nicht vollständig geklärt, wie sich Proteinlösungen beim Auftrag auf CN-Membranen verhalten. Abhängig von der Proteinkonzentration zeigen die Lösungen unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Benetzung der Membranen und der Eindringtiefe. Beim Verdunsten der Lösung können Proteine folglich in verschiedenen Tiefen der Membranstruktur in unterschiedlicher Konzentration immobilisiert werden. Ein Profil der Proteinverteilung entlang des Membranquerschnitts nach der Trocknung der Streifen kann allerdings mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht ermittelt werden.

Ebenso kann eine Überladung der Membranstruktur mit dem Fängerreagenz im Bereich der Testlinie dazu führen, dass sich die MC-LR:BSA-Moleküle derart dicht aneinander lagern, dass sie sich bei einer immunchemischen Reaktion mit dem Goldkonjugat gegenseitig behindern, weil die notwendigen Epitope sterisch blockiert werden. Auch dieser Effekt ist auf die kaum vorhersagbare Trocknung der Proteinlösung zurückzuführen.

Eine sinnvolle digitale Auswertung der Teststreifen kann bei Vorliegen der beschriebenen Effekte nicht erfolgen. Daher wurde auch an dieser Stelle auf die Erhebung von Intensitätsdaten verzichtet.



Im rechten Bild in Abb. 55 - der Teststreifen wurden mit verdünntem Fängerreagenz (1 mg/mL) behandelt - ist die Linienintensität über die ganze Verdünnungsreihe betrachtet zwar insgesamt schwächer als im linken Bild, dafür zeigt sich aber bereits eine nahezu einheitliche Verringerung des Testsignals mit steigender Analyt-Konzentration. Das Testsignal der Nullprobe fällt allerdings kaum stärker aus als das der darauf folgenden Proben (1; 2,5; 5 ng/mL). Deutlich wird dieses in der digitalen Auswertung der Testlinienintensitäten, die in Abb. 56 dargestellt ist. Es ist eine Verringerung des Testsignals bei Er-

höhung der MC-LR-Konzentration zu erkennen, die von etwa 35.000 rel. Einheiten auf etwa 10.000 rel. Einheiten absinkt. Allerdings verläuft die Intensitätskurve deutlich flacher als erwartet. Bei der Auftragung wurde auf der Intensitätsachse bewusst ein Maßstab gewählt, der die angestrebte Linienintensität der Nullprobe widerspiegelt.

Fazit

Diese ersten Ergebnisse mit einem MC-LR-Schnelltest zeigen, dass mit den gewählten, kommerziell erhältlichen und selbst hergestellten Ausgangsmaterialien ein funktionsfähiges Testsystem entwickelt werden kann, das den gestellten Anforderungen genügt. Allerdings wird aus den Ergebnissen auch deutlich, dass zum Erreichen dieses Ziels noch einige Optimierungen notwendig sind. Im Fokus der weiteren Untersuchungen soll zunächst eine Anpassung der Standard-LFD-Komponenten auf den konkreten MC-LR-Test stehen.

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems

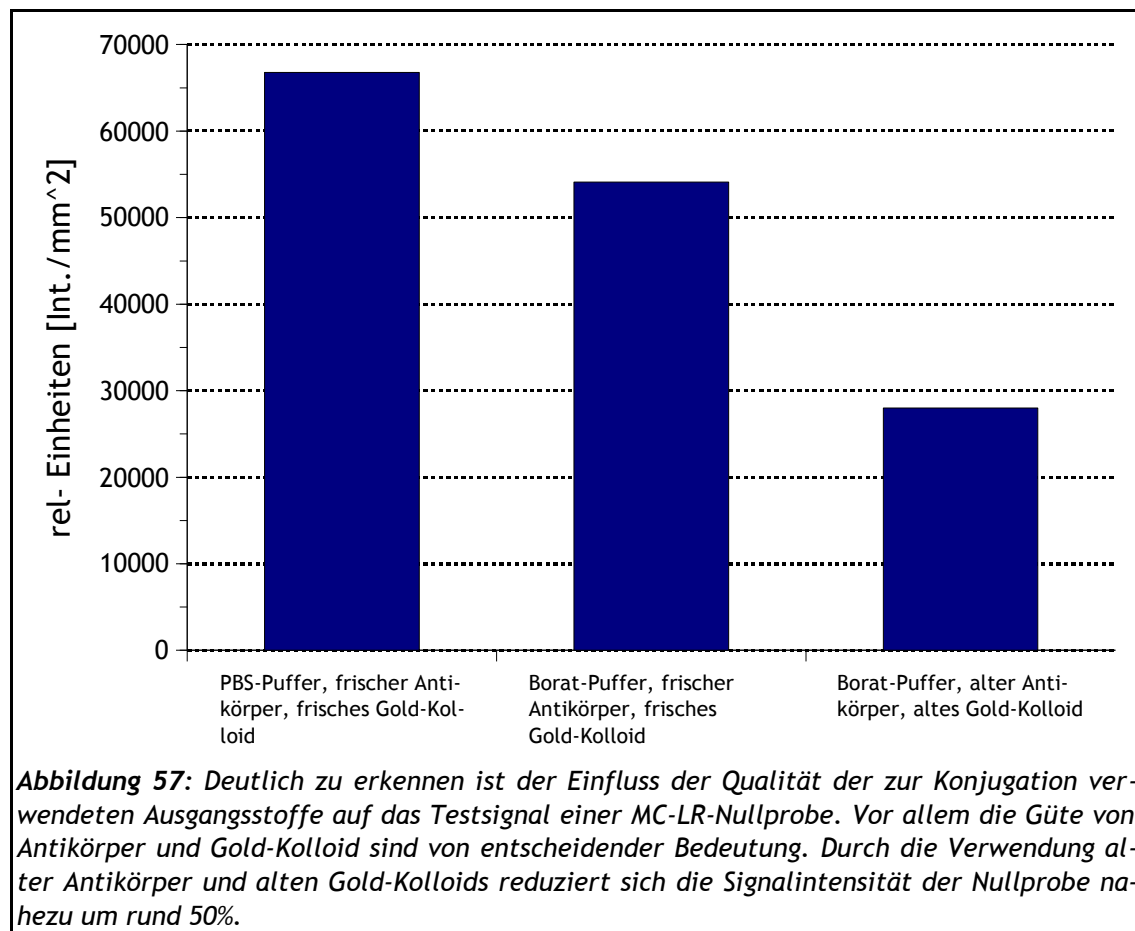
Bei den weiteren Entwicklungsarbeiten soll zunächst eine grundsätzliche Verbesserung des Testsignals im Mittelpunkt stehen. Dabei soll sowohl eine eindeutige Erkennbarkeit des Signals einer Nullprobe sichergestellt werden und ebenso die Unterscheidbarkeit dieses „Nullsignals“ von Signalen, die aus MC-LR-haltigen Proben ermittelt wurden. Mit diesen Arbeiten einhergehen wird die Validierung der Protokolle für die Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates und die Imprägnierung der Conjugate Pads. Ziel ist es dabei, die Protokolle bei gleichbleibender oder besserer Funktionsfähigkeit der Teststreifen möglichst robust zu gestalten.

Außerdem sollen weitere Versuche Erkenntnisse über die Lagerungsfähigkeit der Ausgangsmaterialien und der fertigen Teststreifen bringen. Es wurde bereits bei den Vorarbeiten (Kap. 1.2.3) darauf verwiesen, dass die Weiterführung der vielversprechenden Stabilitätsuntersuchungen aus verschiedenen Gründen an dem konkreten Testsystem erfolgen soll.

Alle Optimierungsbemühungen sollen letztendlich zu einem verlässlichen MC-LR-Standard-Testsystem führen, das die Grundlage für weitere Anpassungsversuche an reale Testbedingungen bilden soll.

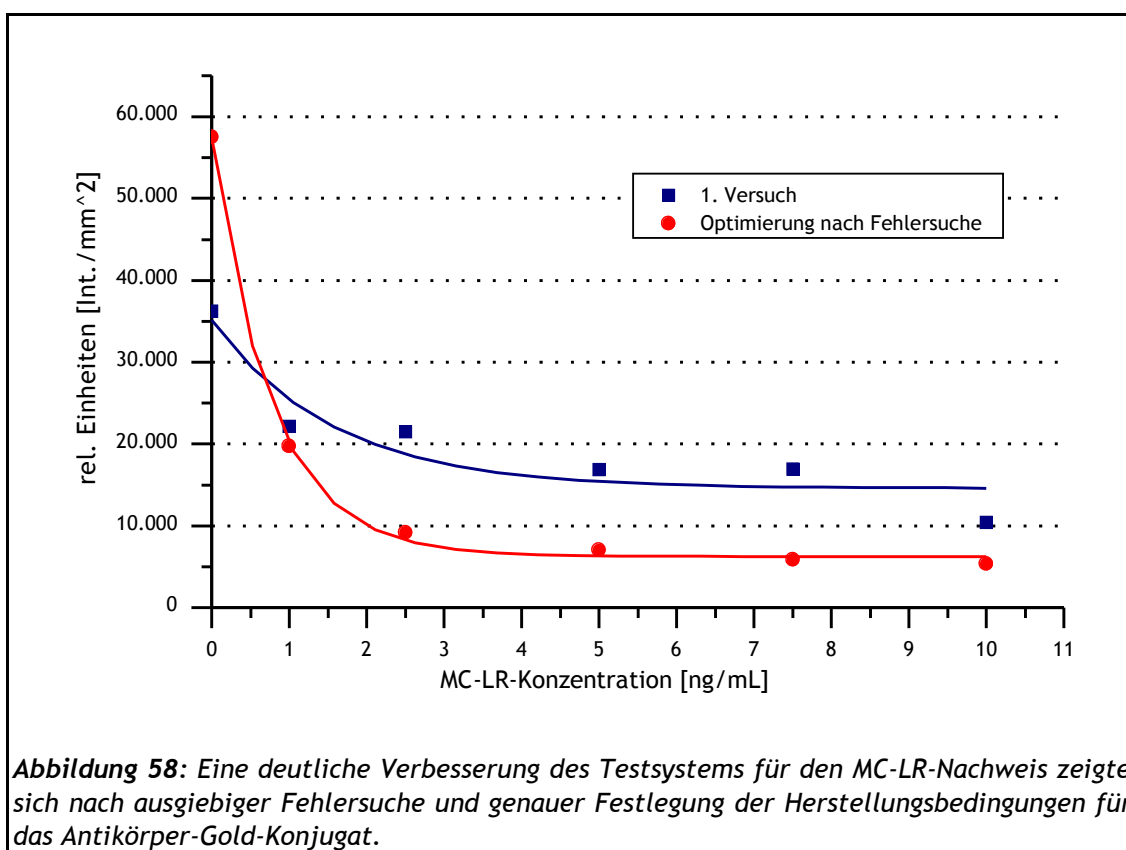
7.3.1 Optimierung des Testsignals hinsichtlich der Erkennbarkeit

Aus den Abb. 55 und lässt sich ersehen, dass im ersten Versuch eines MC-LR-Schnelltests kein zufriedenstellendes Testergebnis hinsichtlich der Erkennbarkeit des Testsignals gegeben ist. Zwar lässt sich ein Nullsignal eindeutig erkennen, die Steigerung der Intensität dieses Signals wäre jedoch notwendig, um etwaige Fehlinterpretationen bei der Testanwendung auszuschließen.



Empirische Erkenntnisse für das erläuterte Optimierungsproblem wurden bei mehreren Versuchen gesammelt, die eigentlich einer Überprüfung der Reproduzierbarkeit des entwickelten Tests dienen sollten. Nachdem in diesen Versuchen die bereits erhaltenen Ergebnisse zunächst nicht bestätigt werden konnten - MC-LR konnte in dotierten KPP-Proben überhaupt nicht nachgewiesen werden - führte eine umfangreiche Fehlersuche zu der Erkenntnis, dass nur die Verwendung möglichst frischer Ausgangsmaterialien und besonders sauberer Reaktionsgefäße eine erfolgreiche Konjugat-Herstellung ermöglichen. Mehrfach aufgetaute Antikörperlösung bzw. zu kleine, eingefrorene Aliquote der Antikörperlösung führten ebenso wie die Verwendung von über län-

gere Zeit gelagerten Puffer-, BSA- oder Gold-Lösungen zu einem nicht bzw. nicht zufriedenstellend funktionierenden Konjugat. Auch der Gebrauch von Glasgeräten bei der Vorbereitung der kolloidalen Gold-Lösung (Einstellen des pH-Wertes), die nicht mit Königswasser gereinigt worden waren, hatten negative Auswirkungen auf die Konjugatqualität. Weniger Einfluss hatte die Zusammensetzung des Puffers, in dem der Antikörper vor der Zugabe zur kolloidalen Gold-Lösung gelöst wird. Untersucht wurden Glycerin-haltige PBS-Puffer und Borat-Puffer. Einige Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 57 dargestellt.



Am Ende der Fehlersuche konnte reproduzierbar unter sehr eng gesteckten Anforderungen wieder ein befriedigend funktionsfähiges Konjugat erhalten werden. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den ersten Versuchen auch eine deutlich höhere Intensität bei geringen MC-LR-Konzentrationen, die im Folgenden auch reproduziert werden konnte (Abb. 58). Ebenso verschob sich der dynamische Bereich des Intensitätsverlaufs in Richtung geringer MC-LR-Konzentrationen. Es konnte bereits visuell besser zwischen MC-LR-freien und kontaminierten Proben unterschieden werden. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass bei den ersten Versuchen keine optimalen Herstellungsbedingungen herrschten. Genauer konnten die negativen Einflüsse auf die Konju-

gatqualität allerdings nicht differenziert werden.

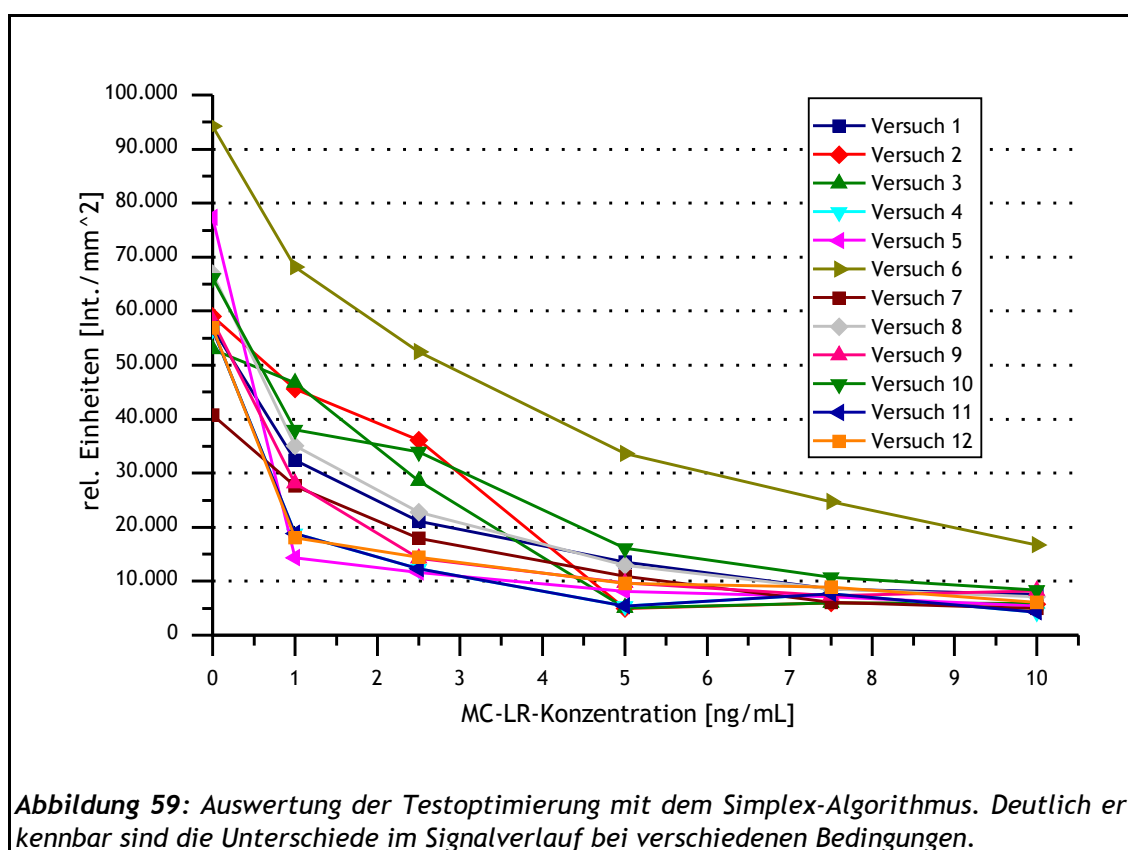
7.3.2 Optimierung des Testsignals hinsichtlich der Testsensitivität

Optimierung mit Hilfe des Simplex-Algorithmus

Bereits bei der Entwicklung und Optimierung des SEB-Schnelltests wurde auf die Möglichkeiten einer Algorithmus-unterstützten Optimierung zurückgegriffen. Auch beim MC-LR-Test soll diese Technik mit Hilfe des Simplex-Algorithmus angewendet werden. Dabei werden dieselben Variablen verwendet wie beim SEB-Test (Imprägnierung des Conjugate Pads mit verschiedenen Gehalten an Tween 20® und BSA, pH-Wert des Imprägnierungspuffers, eingesetztes Konjugat-Volumen, vgl. Kap. 6.3.3). Allerdings sollen diese Faktoren nun in der Form variiert werden, dass die Steigung des Intensitätsverlaufs im dynamischen Bereich des Testsystems möglichst groß wird und außerdem der dynamische Bereich möglichst weit in Richtung einer geringen MC-LR-Konzentration verschoben wird. Es wird somit eine Minimierung der Sichtbarkeitsgrenze hinsichtlich der MC-LR-Konzentration in der Probe bei gleichzeitigem Erhalt eines eindeutigen Nullsignals angestrebt. Es kann bei den Versuchen folglich nicht nur um eine generelle Unterdrückung/Verhinderung der immunchemischen Reaktionen während der Testdurchführung gehen, die zur Ausbildung des Testsignals führt, denn eine solche hätte zwangsläufig auch ein indifferentes Nullsignal zur Folge.

Für die Optimierung der Testsensitivität wird wie schon bei der Entwicklung des SEB-Tests eine Reihe von Versuchen durchgeführt, um eine Grundlage für den Simplex-Algorithmus zu bieten. Dabei werden die Anteile von Tween 20® und BSA in Imprägnierungspuffer I (S. 177) für das Conjugate Pad sowie das eingesetzte Konjugat-Volumen schrittweise variiert. Die durch die Testdurchführung und digitale Auswertung erhaltenen Daten werden hinsichtlich der Testsensitivität (konkret: der Sichtbarkeit einer Testlinie bei einer bestimmten MC-LR-Konzentration) bewertet und in ein Simplex-Tableau eingetragen. Als „Sichtbarkeitsgrenze“, die durch einen Vergleich zwischen digitalen Daten und visuellem Eindruck mehrerer Versuchspersonen ermittelt wurde, gilt in diesem Versuch eine Intensität von 6000 relativen Einheiten (Int./mm^2). Im Simplex-Tableau werden die an dieser Sichtbarkeitsgrenze vorliegenden MC-LR-Konzentrationen als Minimierungsziel eingesetzt. Eine Bewertung der Nullprobenintensität soll im Anschluss an die Simplex-Optimierung erfolgen.

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems

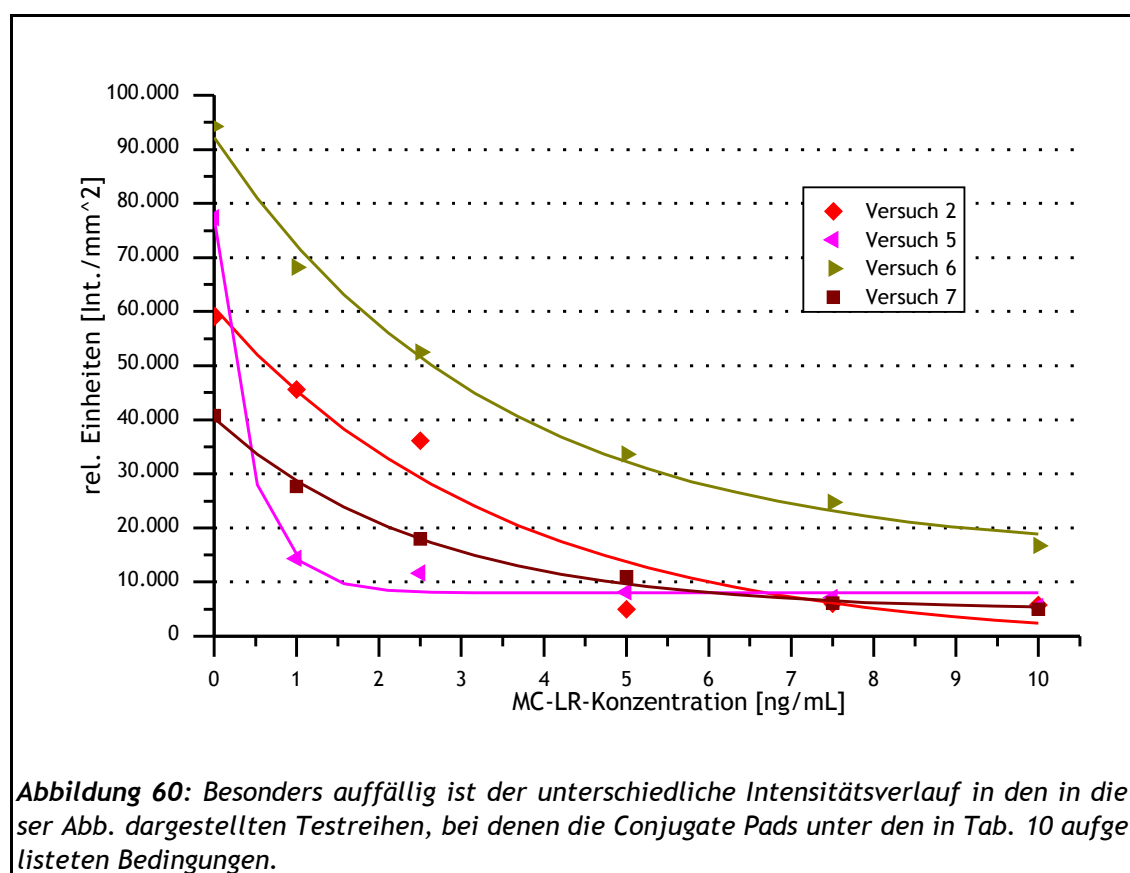


Die durch den Algorithmus berechneten Werte für die Variablen werden dann ebenfalls experimentell überprüft und wiederum ins Simplex-Tableau eingefügt. Die grafische Auftragung der Daten ist in Abb. 59 dargestellt.

Es lässt sich in Abb. 59 deutlich erkennen, dass eine Veränderung der beschriebenen Faktoren einen deutlichen Einfluss auf den Intensitätsverlauf der Testsignale hat. Bereits geringe Veränderungen in den beschriebenen Bereichen führen zu unterschiedlichen Intensitätsverläufen. Besonders deutlich werden die Auswirkungen bei den als Versuch 2, 5, 6 und Versuch 7 gekennzeichneten Testreihen, die in Abb. 60 zur Verdeutlichung noch einmal hervorgehoben sind.

Das beste Ergebnis unter den gewählten Bedingungen zeigt sich in Versuch 2 bei einer Imprägnierung mit pH 8; 0,25% (w/w) Tween 20®; 0,75% (w/w) BSA und 2,5 µL Konjugat. Die Signalintensität verläuft im Vergleich zu Versuch 5 zwar schon relativ flach und weist zudem noch leichte Unregelmäßigkeiten auf. Allerdings liegt die Sichtbarkeitsgrenze unter diesen Bedingungen bei einer MC-LR-Konzentration von 5 ng/mL. In weiteren Versuchen konnte eine Grenzkonzentration von 7,5 ng/mL MC-LR sicher reproduziert werden. Dieses Ergebnis liegt deutlich unterhalb der Sichtbarkeitsgrenzen der anderen

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems



Testreihen (Tab. 10). Der Unterschied zwischen dem Nullsignal und der Sichtbarkeitsgrenze ist unter den für diese Testreihe gewählten Bedingungen dennoch auch visuell deutlich erkennbar.

Tabelle 10: Tabellarische Aufstellung der Ergebnisse aus Abb. 60.

Versuch	pH	Tween 20® [% (w/w)]	BSA [% (w/w)]	Konjugatvol. [μL]	Sichtbarkeitsgrenze [ng/mL MC-LR]
2	8	0,25	0,75	2,5	≈ 5,0 - 7,5
5	8	2,00	0,50	4,0	≈ 10,0
6	8	1,50	2,50	3,5	> 10,0
7	8	0,50	1,50	2,5	≈ 10,0

In Tab. 10 lässt sich die Abhängigkeit der Signalintensitäten von den gewählten Bedingungen erkennen. Vergleichsweise geringe Konzentrationen an Tween 20® und BSA im Imprägnierungspuffer für das Conjugate Pad und ein vergleichsweise geringes Konjugatvolumen führen unter den Testbedingungen zu dem besten Ergebnis. Einer Erhöhung der Tween 20®- und BSA-Konzentrationen führt zu einem deutlich schlechteren Ergebnis hinsichtlich der Testsensitivität (vgl. Versuch 2 und Versuch 7). Noch ungeeigneter werden die Test-

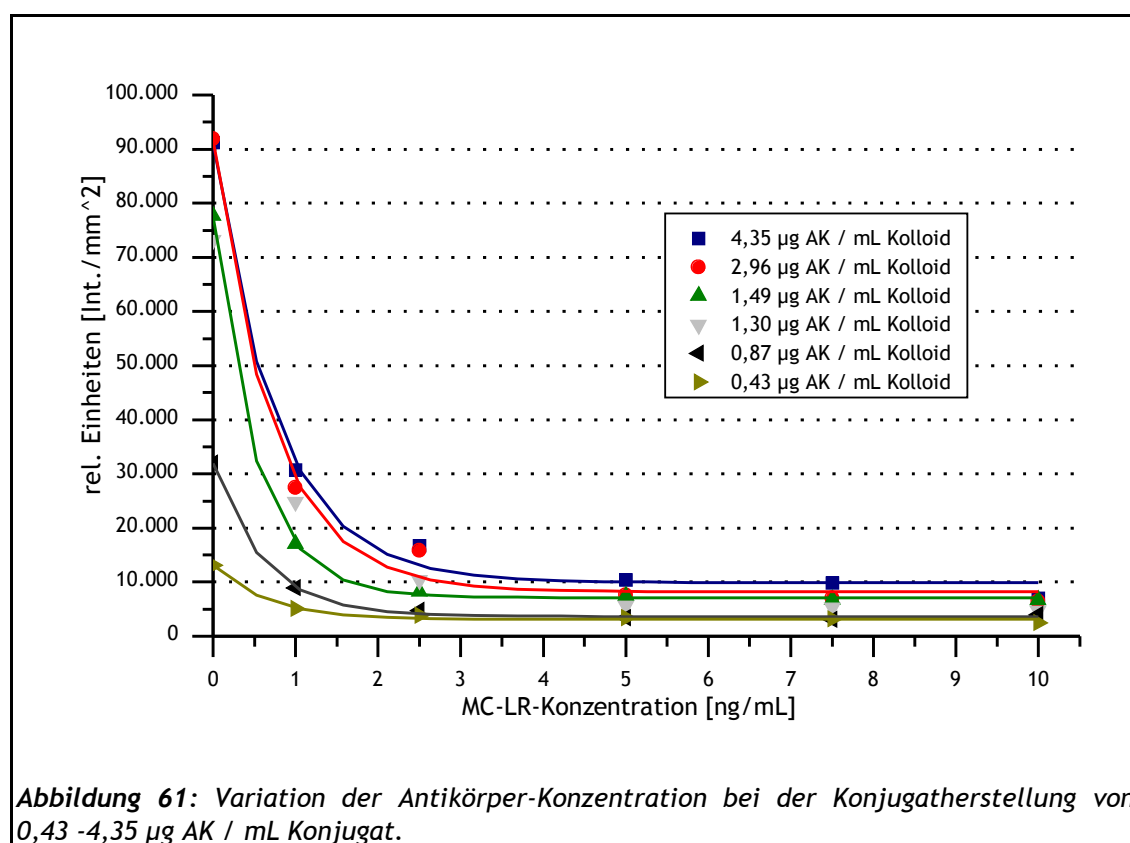
streifen, wenn außerdem noch ein vergleichsweise großes Konjugatvolumen eingesetzt wird (vgl. Versuch 6).

Optimierung der Antikörperkonzentration im Konjugat

Ein weiterer Ansatz, die Sensitivität des Testsystems zu verändern, liegt in einer Variation der Konzentration des eingesetzten Antikörpers während der Konjugatherstellung. Bereits in Kap. 1 wurde die Notwendigkeit der Optimierung der Antikörperkonzentration zwecks Stabilisierung des zu bildenden Antikörper-Gold-Konjugates beschrieben. An dieser Stelle soll nun untersucht werden, inwieweit die Veränderung der Antikörperkonzentration die Intensität des resultierenden Testsignals beeinflusst. Es wird dabei davon ausgegangen, dass eine Verringerung der Antikörperkonzentration bei der Konjugatherstellung auch zu einer Verringerung der Linienintensität im anschließenden Test führt, da statistisch weniger Antikörpermoleküle zur Verfügung stehen, die im kompetitiven Test blockiert werden müssten. Es sollte demzufolge im Test bereits bei geringeren MC-LR-Konzentrationen eine Abnahme der Testlinienintensität auftreten.

Um diesen Ansatz zu untersuchen, werden Versuche unter den beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt. Bei der Konjugatherstellung wird die Antikörper-Konzentration zwischen 4,35 µg/mL Kolloid (ermitteltes Optimum für die Konjugation) und 0,43 µg/mL Kolloid variiert. Die Herstellung erfolgt ansonsten nach den beschriebenen Standardbedingungen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 61 dargestellt.

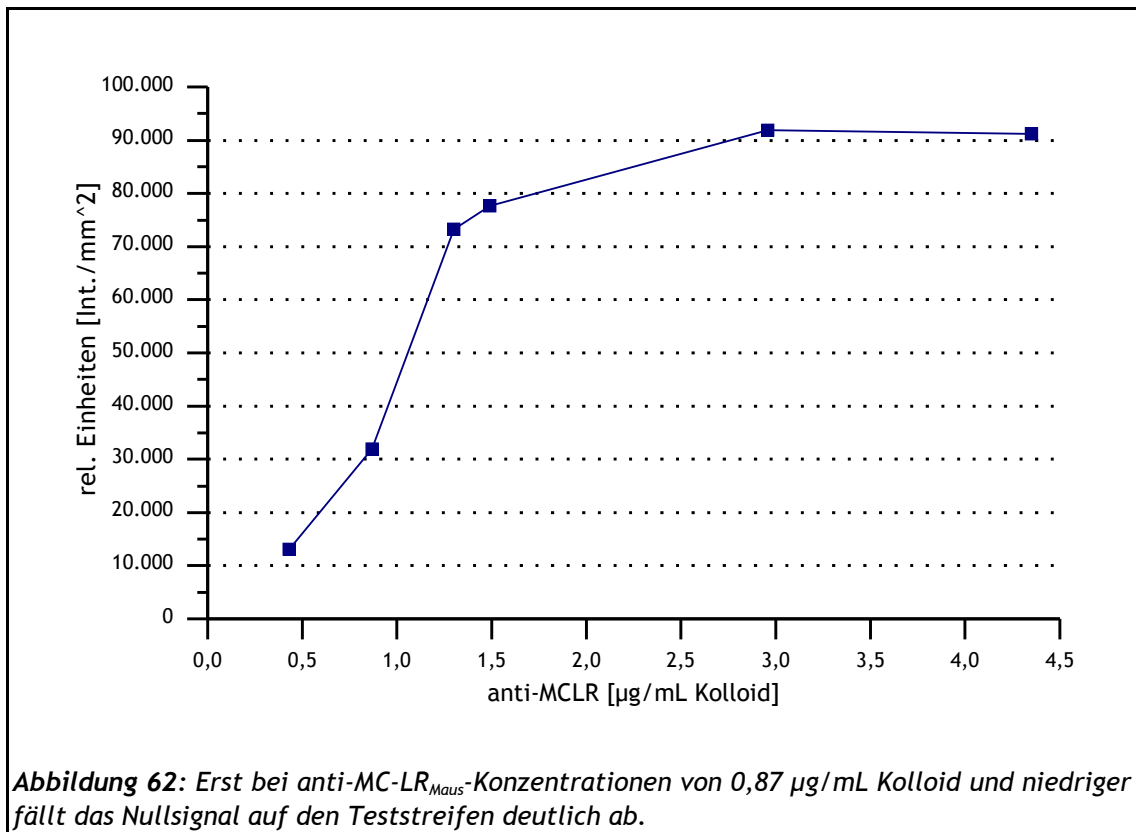
Es zeigt sich in den Versuchen ein deutlicher Unterschied in den Intensitätsverläufen bei unter verschiedenen Bedingungen hergestellten Antikörper-Gold-Konjugaten. Dabei ergibt erwartungsgemäß das mit der zuvor als optimal stabilisierend wirkenden anti-MC-LR-Konzentration von 4,35 µg/mL Kolloid hergestellte Konjugat mit die höchste Nullintensität. Allerdings weisen auch Konjugate, die mit AK-Konzentrationen von bis zu 1,3 µg/mL Kolloid hergestellt wurden, deutliche Nullsignale auf. Der Signalabfall bei einer MC-LR-Konzentration von 1 ng/mL in den untersuchten Proben fällt bei diesen Konjugaten deutlicher aus als bei dem „Optimal-Konjugat“. Im weiteren Verlauf zu höheren MC-LR-Konzentrationen verhält sich die Signalintensität jedoch ähnlich.



Ein deutlicher Unterschied im Intensitätsverlauf ist erst ab einer AK-Konzentration von 0,87 µg/mL im Kolloid und weniger bei der Konjugatherstellung zu erkennen. Dieses lässt sich besonders gut in Abb. 62 erkennen. Bei der oben genannten und der darunter liegenden Konzentration von 0,43 µg/mL Kolloid zeigt sich auf den Teststreifen ein deutlich verringertes Nullsignal gegenüber den Signalen bei höheren AK-Konzentrationen. Zwar fallen bei den Proben mit geringeren AK-Konzentrationen auch die Testsignale für 1 ng/mL MC-LR niedriger aus, allerdings ist auch das Verhältnis des Nullsignals zum 1 ng/mL-Signal deutlich geringer, was die Unterscheidbarkeit der Signale mit bloßem Auge erschwert.

Grundsätzlich lassen sich durch das beschriebene Verfahren die Eigenschaften des anti-MC-LR-Konjugates beeinflussen. Es ist jedoch fraglich, ob die hergestellten Konjugate über die gleiche Stabilität verfügen wie das „Optimal-Konjugat“. Durchaus denkbar ist, dass die zusätzliche Stabilisierung mit BSA während der Konjugation nicht ausreicht, um den Mangel an Antikörpern in der Reaktionslösung auszugleichen. Weitere Untersuchungen dieses Sachverhaltes wären wünschenswert, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Für die Weiterführung der Konjugat-Optimierung soll

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems



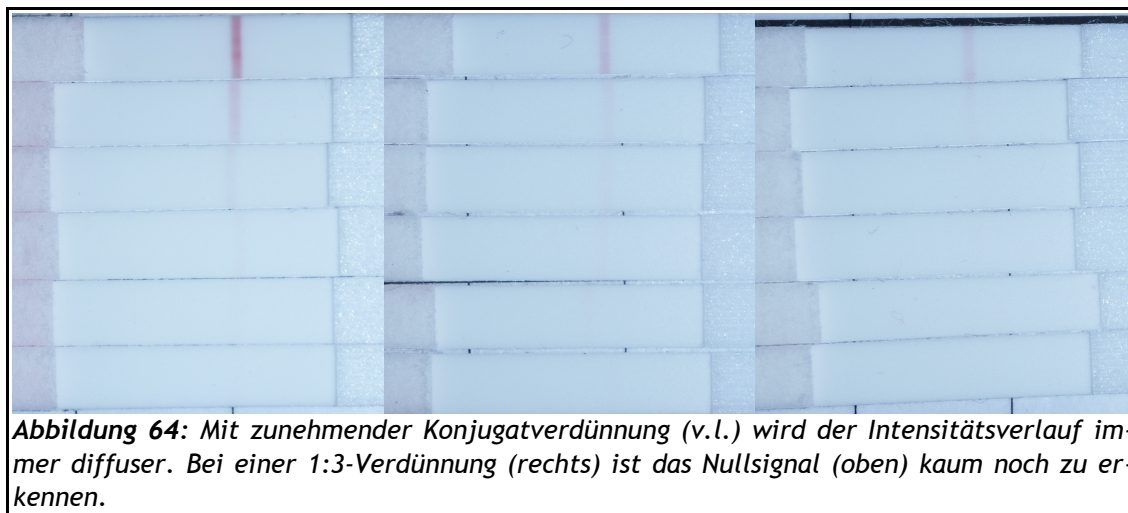
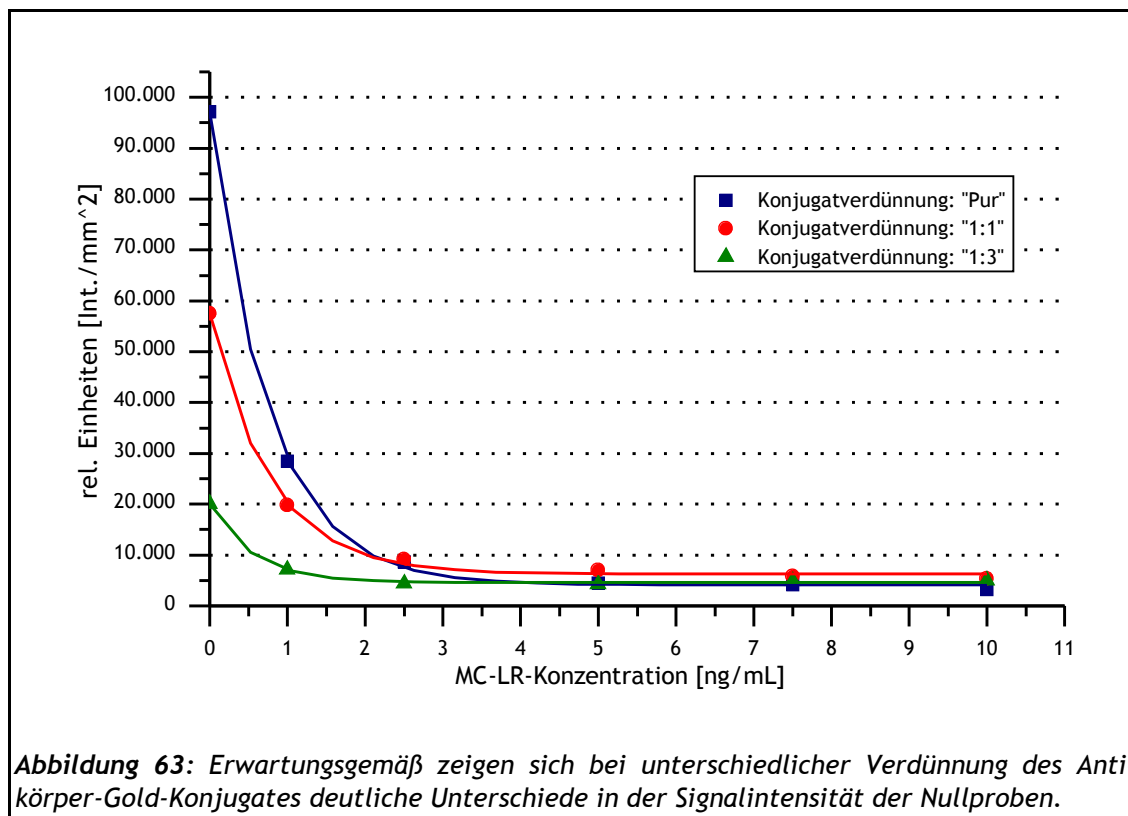
die zuvor ermittelte, optimale AK-Konzentration von 4,35 $\mu\text{g/mL Kolloid}$ bei der Konjugation beibehalten werden, da der durch die Verringerung der AK-Konzentration erzielte Effekt als nicht erheblich genug bewertet wird.

Variation der Konjugatverdünnung

Bei den Optimierungsversuchen mit Hilfe des Simplex-Algorithmus wurde die für die Ausbildung des Testsignals zur Verfügung stehende Menge an markierten Goldpartikeln durch das eingesetzte Konjugatvolumen reguliert. Allerdings sind dieser Variationsmöglichkeit Grenzen gesetzt, wegen der nicht unbegrenzt möglichen Volumenverringerung und eines Pipettierfehlers, der bei geringen Volumina deutlich zu Tage tritt. Durch eine Verdünnung des hergestellten Konjugates in verschiedenen Verhältnissen kann der beschriebene Faktor in einem deutlich größeren Bereich variiert werden.

Um den Einfluss der Konjugat-Verdünnung auf die Signalintensität zu untersuchen, soll das Konjugat unverdünnt sowie in den Verdünnungsverhältnissen „1:1“ (normales Verhältnis) und „1:3“ mit Lagerungspuffer III (S. 180) verdünnt eingesetzt werden. Eine genauere Angabe der Konjugatkonzentration ist wie in Kap. 6 beschrieben mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich.

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems



Es zeigt sich erwartungsgemäß mit zunehmender Verdünnung des Konjugates eine Abschwächung der Signalintensität bei den Nullproben (Abb. 63). Zwar reduziert sich mit zunehmender Verdünnung auch die „Sichtbarkeitsgrenze“ für das Testsystem, allerdings lassen sich die Testlinien für 0 ng/mL MC-LR und 1 ng/mL MC-LR bei einer „1:3“-Verdünnung visuell kaum noch unterscheiden (vgl. auch Abb. 64). Bei einer „1:1“-Verdünnung ist diese Unter-

scheidung ohne weiteres möglich, ebenso bei Einsatz des unverdünnten Konjugates.

7.3.3 Untersuchung der Ausgangsmaterialien und des Testsystems hinsichtlich der Langzeitstabilität

An dieser Stelle soll auf die Langzeitstabilität der einzelnen Testkomponenten und Ausgangsmaterialien eingegangen werden. Dabei werden jedoch nur Komponenten betrachtet, die selbst hergestellt bzw. modifiziert werden. Die kommerziell erhältlichen Materialien (Membranen, Pads, kolloide Gold-Lösung, Antikörper, Toxine) werden nach Herstellerangaben gelagert und im Rahmen der vom jeweiligen Hersteller angegebenen Verwendbarkeitsfrist benutzt.

Bereits [Tippkötter, 2005] wies auf die mögliche positive Wirkung von Zuckerzusätzen zu dem Konjugat hinsichtlich der Langzeitstabilität hin. Auch bei [Newson, 2002] gibt es Hinweise darauf. Neuere Informationen von [O'Farrell, 2005] legen nahe, dass die Zugabe von Zuckerlösungen zur Konjugatlösung direkt vor dem Auftrag auf die Pads zum einen zu einer Stabilisierung des Antikörper-Gold-Konjugates hinsichtlich eines Zerfalls führen und zum anderen die nach längerer Lagerung unter den Testbedingungen irreversible Bindung von Gold-Partikeln und Antikörpern an das Material des Conjugate Pads verhindern. Besonders vorteilhafte Eigenschaften bei der Stabilisierung sollen Trehalose und Sucrose haben. Ein Gesamtzuckergehalt von bis zu 20% (w/w) soll die gewünschte Stabilisierung ermöglichen.

Die Stabilisierung der Konjugate auf dem Conjugate Pad ist auf eine „Verkapselung“ der Antikörper-Gold-Partikel durch die Zuckermoleküle zurückzuführen. Beim Trocknen des aufgetragenen Konjugates bildet der Zucker einen Käfig um die Partikel und verhindert damit eine Anbindung von Proteinen oder freier Oberflächenplätze der Gold-Partikel an die Oberflächenstruktur des Pad-Materials. Außerdem werden auch die Proteine selbst stabilisiert, und sie werden weniger anfällig für äußere Einflüsse. Beim Einwirken der Probenlösung auf das verkapselte Konjugat löst sich der Zucker schnell auf und gibt die Konjugate frei.

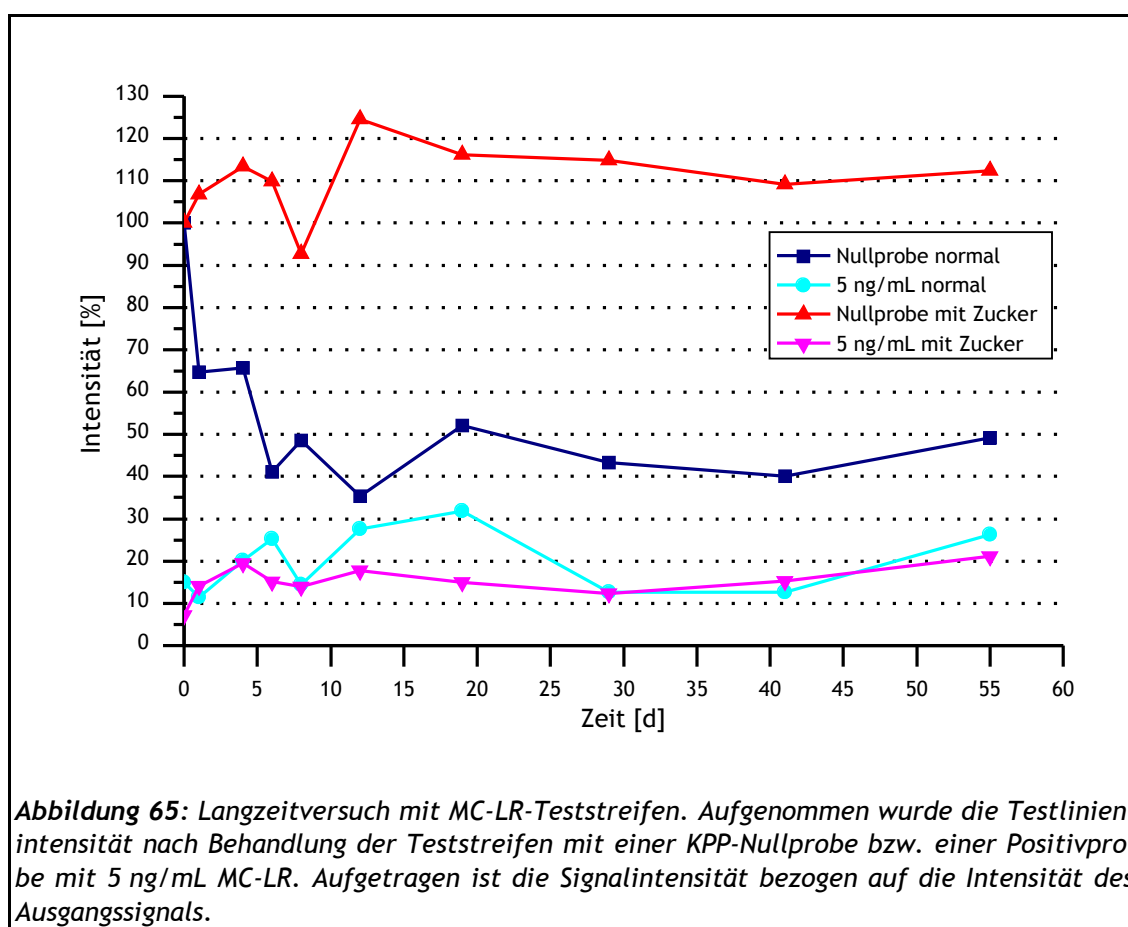
Zur Überprüfung der beschriebenen theoretischen Grundlagen wird Lagerungspuffer III, der zur Verdünnung des frisch hergestellten Konjugates verwendet wird, entsprechend mit Trehalose und Sucrose dotiert, um eine Zucker-Endkonzentration von jeweils 10% (w/w) zu erhalten. Das so behandelte

Konjugat wird im Vortexer gründlich vermischt und sofort auf die vorbereiteten Teststreifen aufgetragen. Die Teststreifen werden bei RT für 30 min getrocknet und danach unter Lichtabschluss bei RT in einem Exsikkator über Kieselgel gelagert. Auf diese Weise sollen die für LFD-Teststreifen üblichen Lagerungsbedingungen (mit Trockenmittel eingeschweißt in licht- und luftdichte Verbundfolie) simuliert werden.

Parallel dazu hergestellte Teststreifen ohne Zuckerzusatz werden unter den gleichen Bedingungen aufbewahrt. In verschiedenen Abständen wird je ein vorbereiteter Streifen jeder Art mit einer KPP-Nullprobe sowie mit einer Positivprobe mit einer Konzentration von 5 ng/mL MC-LR untersucht.

Deutlich erkennbar ist in Abb. 65 der Abfall des Testsignals der Nullprobe bei den nicht mit Zuckern behandelten Teststreifen schon wenige Tage nach der Herstellung des Konjugates. Während das Nullsignal auf diesen Streifen anfangs zunächst noch mit dem Signal auf den Zucker-behandelten Teststreifen vergleichbar ist, hat sich das Nullsignal bereits nach gut einer Woche stark verringert und ist nur noch unwesentlich stärker als das der Positivprobe. Eine visuelle Unterscheidung der Proben ist spätestens ab einer Lagerungsdauer von 10 Tagen nicht mehr eindeutig möglich. Auf den Teststreifen, die mit Positivproben behandelt wurden, verändert sich die Signalintensität über den beobachteten Zeitraum kaum. Sie zeigt sich aber deutlich weniger konstant als die auf den vorbehandelten Teststreifen.

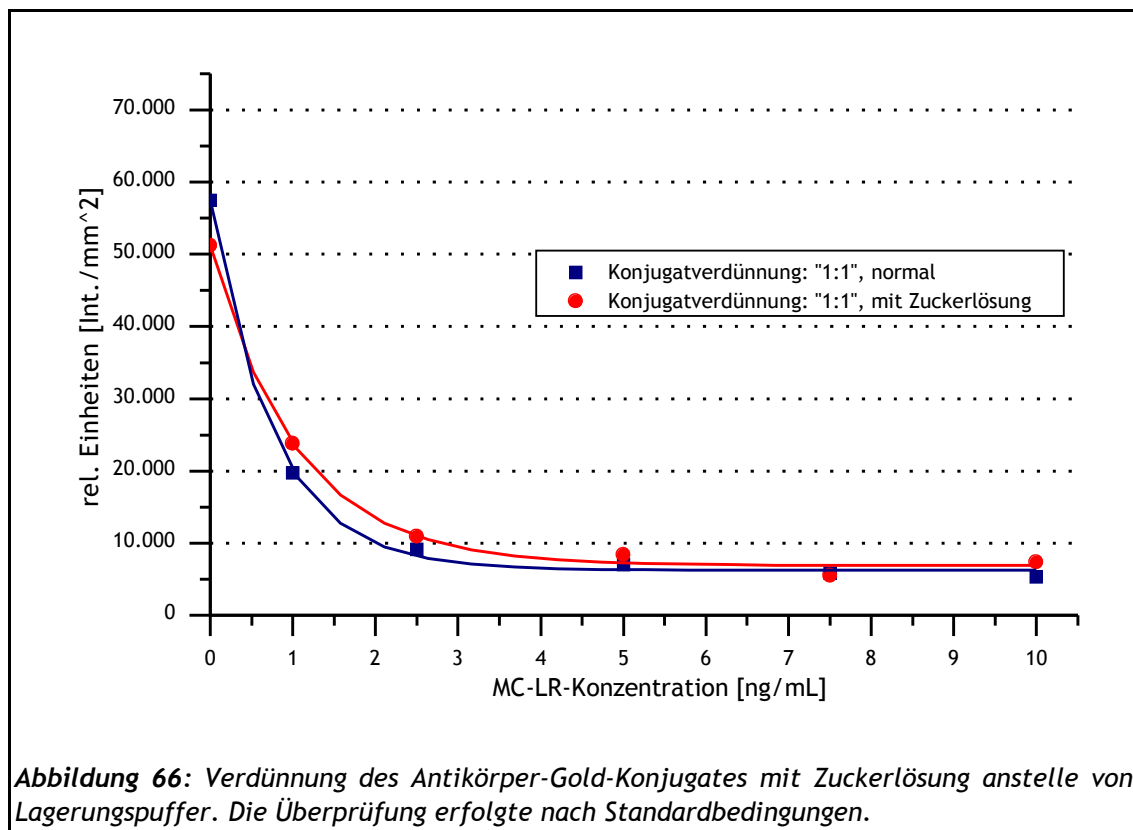
Auch zeigt sich das Nullsignal auf den Teststreifen mit vorbehandeltem Konjugat bis auf einen Wert nach 10 Tagen vergleichsweise konstant und auf deutlich höherem Niveau als auf den Teststreifen mit nicht vorbehandeltem Konjugat. Während des Beobachtungszeitraumes kann keine signifikante Verringerung des Signals festgestellt werden. Das weist auf die beschriebene Wirkung der eingesetzten Zuckerlösung auf die Lagerungsstabilität des Konjugates hin.



Zusätzlich zur Lagerungsstabilität der Teststreifen anhand der beschriebenen Tests werden auch die Auswirkungen der Zuckerlösung auf die grundsätzliche Qualität der Testsignale bzw. auf den Intensitätsverlauf untersucht. Dabei zeigte sich - wie in Abb. 66 dargestellt -, dass der Zuckerzusatz keinen nennenswerten Einfluss auf die Testergebnisse hat.

Zwar hatten auch die in Kap. 1 beschriebenen Veränderungen eine Verbesserung der Lagerungsstabilität der Teststreifen zur Folge, allerdings konnten die Anforderungen an die Lagerungsbedingungen durch die Zuckerzugabe zum Konjugat deutlich verringert werden. Ein kontrolliertes Einfrieren und Gefrorenhalten der Teststreifen oder des Konjugates ist in diesem Fall nicht notwendig. Wie beschrieben gleichen die hier eingestellten Lagerungsbedingungen den ohnehin für die Lagerung von LFD-Tests üblichen Anforderungen.

7.3 Optimierung des Standard-Testsystems



7.3.4 Fazit

Durch vielfältige Optimierungsansätze konnte ein funktionsfähiges Testsystem für MC-LR in wässrigen Pufferlösungen etabliert werden. Dabei wurde der Einfluss verschiedenster Faktoren auf die Testergebnisse untersucht. Vor allem die eigene Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates bietet vielfältig Anpassungsmöglichkeiten an den jeweiligen Analyten. Es wurde festgestellt, dass eine optimale Feinabstimmung und eine konkrete Definition aller Herstellungsbedingungen und -schritte notwendig sind, um ein mit guter Sensitivität funktionierendes Konjugat zu erhalten.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass neben Modifikationen an der Herstellung des Antikörper-Gold-Konjugates auch bei diesem kompetitiven Testsystem eine Variation der Imprägnierung der Conjugate Pads zur Optimierung der Funktionsfähigkeit beiträgt. Bereits geringe Veränderungen in der Zusammensetzung des Imprägnierungspuffers können entscheidende Auswirkungen auf den Intensitätsverlauf der Testsignale haben.

Neben den Versuchen, die tatsächlich zur Optimierung der Herstellung hinsichtlich einer optimalen Funktionsfähigkeit der Teststreifen führten, wurden

noch weitere Variationsmöglichkeiten der Herstellungsbedingungen aufgezeigt und zum Teil verfolgt, die eine weitere Optimierung des funktionierenden Tests ermöglichen könnten. Das MC-LR-Testsystem bietet in diesem Bereich noch großes Potenzial für weitere Arbeiten. So wurde in der vorliegenden Arbeit nur wenig Zeit auf die Optimierung des MC-LR:BSA-Fängerreagenz' verwendet. Es ist durchaus denkbar, dass einer feineren Abstimmung der Reaktionsbedingungen zu diesem Reagenz eine weitere Optimierung des Testsystems folgen könnte. Allerdings soll dieser Ansatz in dieser Arbeit nicht weitergeführt werden. In den folgenden Kapiteln soll vielmehr die Anwendung des Testsystems auf ein reales Test-Umfeld und eine eventuell notwendige Anpassung im Mittelpunkt stehen.

7.4 Versuche mit Realproben und Anpassung des Testsystems

Bereits im Theoretischen Teil wurden die Anforderungen an das zu entwickelnde Testsystem und die geplanten Einsatzmöglichkeiten beschrieben. In den nun folgenden Unterkapiteln soll noch einmal kurz auf die jeweiligen Anwendungsgebiete des MC-LR-Schnelltests eingegangen werden, bevor dann die Anpassungen auf die unterschiedlichen Testmilieus vorgenommen werden.

7.4.1 Anpassung des Testsystems auf Wasserproben

Wie im Theoretischen Teil erläutert kann die Analyse von Oberflächengewässern ein Anwendungsgebiet für das entwickelte Testsystem sein. Bei einer solchen Anwendung würden die mehrfach beschriebenen Vorteile der LFD-Tests voll zum Tragen kommen.

Um festzustellen, ob überhaupt eine Anpassung des Standard-Systems auf Wasserproben notwendig ist, werden verschiedene Wasserproben gesammelt bzw. mit Hilfe von kommerziellen Salzmischungen hergestellt und wasseranalytisch charakterisiert. Das Spektrum der Proben reicht dabei von Wässern aus Gartenteichen und Badeseen über Leitungs- und Mineralwasser bis hin zu Seewasser und aufkonzentriertem Seewasser. Von den einzelnen Proben werden der pH-Wert, die Leitfähigkeit und die Trübung untersucht und die ermittelten Werte miteinander verglichen. Einige exemplarische Analysenergebnisse sind in Tab. 11 zusammengestellt.

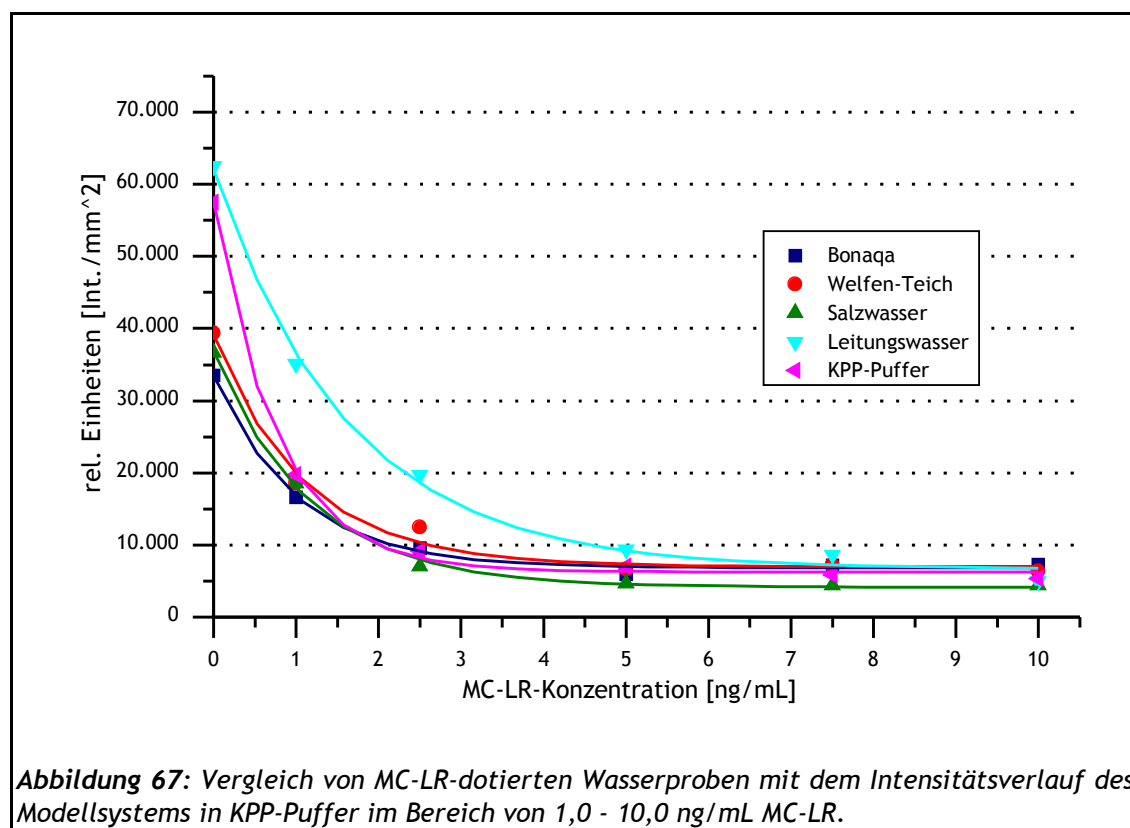
7.4 Versuche mit Realproben und Anpassung des Testsystems

Tabelle 11: Übersicht über die chemisch-physikalischen Eigenschaften der untersuchten Wasserproben.

Wasserprobe	pH-Wert	Leitfähigkeit [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	Trübung [NTU] ¹⁾
Welfen-Teich, Hannover, 07.06.05	7,60	391	22,49
Bonaqa Tafelwasser	5,75	1.400	1,02
Leitungswasser	8,00	600	0,31
Salzwasser aus einer Seesalz-Mischung	8,71	48.500	10,12

1) NTU = Nephelometric Turbidity Units (Nephelometrische Trübungseinheiten)

Ausgehend von hochkonzentrierten MC-LR-Stammlösungen werden mit den untersuchten Wasserproben nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise Verdünnungsreihen bis in den ppb-Bereich erstellt und diese Lösungen mit Teststreifen untersucht. Der Übersichtlichkeit halber werden nur einige Ergebnisse der Wasseruntersuchungen grafisch dargestellt.



In Abb. 67 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Intensitätsverläufe der verschiedenen Wasserproben bei MC-LR-Konzentrationen von 1-10 ng/mL kaum unterscheiden und auch eine gute Übereinstimmung mit dem KPP-Modellsystem aufweisen. Lediglich die Leitungswasser-Probe weicht bei niedri-

gen MC-LR-Konzentrationen leicht vom Verlauf der anderen Kurven ab, gleicht sich aber ab 5 ng/mL MC-LR an. Im entscheidenden Bereich ab 5 ng/mL sind kaum Intensitätsunterschiede auszumachen. Dieser Trend war auch bei der Untersuchung weiterer Wasserproben zu erkennen. Besonders erfreulich ist dieses Ergebnis, da weder eine hohe Ionenkonzentration wie im eingesetzten Salzwasser noch eine starke Trübung wie beim Wasser des Welfenteiches einen großen Einfluss auf die Signalintensität zu haben scheinen. Das am Modell entwickelte Testsystem scheint nach diesen Ergebnissen ohne Modifikationen auch in Oberflächengewässern prinzipiell anwendbar zu sein.

Es muss allerdings angemerkt werden, dass bei der Auswahl der untersuchten Wasserproben zwar versucht wurde, ein weites Spektrum verschiedener physikalischen Eigenschaften (z.B. pH-Wert zwischen pH 5,75 und pH 8,71) abzudecken. Die Auswahl der Proben kann jedoch nicht als repräsentativ angesehen werden. Außerdem wurden die eingesetzten Wasserproben auch weder mikrobiologisch noch auf organische Verunreinigungen untersucht. Es ist durchaus denkbar, dass gerade organische Komponenten - wenn sie in größerer Konzentration vorliegen - den entwickelten Test stören könnten. Umfangreiche weitere Studien sind vor einem routinemäßigen Einsatz des Testsystems für Wasserproben unerlässlich.

7.4.2 Anpassung des Testsystems auf Muschelproben

Vorbemerkungen

Ein Teil der in diesem Kapitel geschilderten praktischen Arbeiten wurde während der Diplomarbeit von Matthias Wawra [Wawra, 2005] angefertigt. Genauere Hintergrundinformationen über die untersuchten Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) und ausführliche Beschreibungen der durchgeführten Versuchsreihen finden sich dort ebenso wie die Beschreibung einer HPLC-Methode zur Analyse von MC-LR. Mit dieser HPLC-Methode konnten MC-LR-Konzentrationen von 1 µg/g Muschel-Feuchtgewicht (FG) erfolgreich nachgewiesen werden. Um eine Vergleichbarkeit der HPLC-Ergebnisse mit den Schnelltestergebnissen zu gewährleisten, wurde das verwendete Miesmuschelfleisch mit einem Standard von 5 µg/mL MC-LR aus *Microcystis aeruginosa* in Methanol dotiert, der auch bei den HPLC-Versuchen zum Einsatz kam.

Vorversuche

Um das entwickelte Standard-Testsystem auf seine Anwendbarkeit auf Mu-

schelfleisch zu untersuchen, soll zunächst je ein Teststreifen in MC-LR-dotierte und undotierte Fleischproben gestellt werden (Probenvolumen 200 µL). Das Muschelfleisch ist zuvor eingefroren, wieder aufgetaut und kurz mit einem Ultraturrax behandelt worden. Unberücksichtigt bleibt bei dieser Vorbehandlung der Meerestiere zunächst, dass diese im realen Einsatzfall des MC-LR-Schnelltests so vermutlich nicht durchzuführen wäre.

Schon während der Testdurchführung kann festgestellt werden, dass sich das Conjugate Pad vollständig mit der Probe zusetzte und verblockte. Danach ist kein gleichmäßiger Probenfluss durch die Membran mehr möglich. Zusätzlich zeigen sich auch auf dem Membranmaterial Verblockungserscheinungen. Insgesamt fließt die eingesetzte Probe nur zu ca. 40% (entspricht 3 cm) der Gesamtlänge (entspricht 7,5 cm) durch die Teststreifen, die sich darüber hinaus aufgrund der starken Färbung der Probe auch noch stark bräunlich verfärben. Insgesamt kann unter diesen Bedingungen kein auswertbares Testsignal erlangt werden. Für die geplante Anwendung besteht folglich eindeutig Optimierungsbedarf entweder beim Aufbau der Teststreifen oder bei der Probenvorbereitung.

Optimierung der Teststreifen

Ein erster Schritt zur Optimierung des MC-LR-Nachweises in Muschelfleisch ist die Ergänzung der bestehenden Teststreifen um ein Sample Pad. Im Theoretischen Teil wurde dessen Funktion u.a. als Vorfilter für partikelreiche Proben bereits diskutiert. In den folgenden Versuchen werden unter den gleichen Bedingungen verschiedenste Materialien als Sample Pads für Muschelfleisch-Partikel getestet und hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf den Probenfluss bewertet. Das Sample Pad hatte eine Länge von ca. 1 cm und wird am unteren Ende des Teststreifens aufgeklebt, wobei es das etwas verkürzte Conjugate Pad leicht überlappt. Die Versuche werden wie im Vorkapitel beschrieben durchgeführt.

In den Testreihen kann festgestellt werden, dass sich von den untersuchten Materialien lediglich eine verstärkte Cellulose-Membran (04-0262-3 R RA 10242, Sartorius AG) für die gestellte Aufgabe eignet (Tab. 12). In mehreren Wiederholungen zeigt sich bei allen anderen Materialien hinsichtlich des Probendurchflusses - wenn überhaupt - nur ein geringer positiver Effekt. Teilweise verringert sich die Durchflusslänge durch den Vorfilter sogar, wenn dieser noch schneller verblockt als das Conjugate Pad im nicht-modifizierten Test-

streifen. Doch auch mit der beschriebenen Cellulose-Membran als Vorfilter kann keine vollständige Aufnahme der Probenflüssigkeit in den Teststreifen erreicht werden. Immerhin aber wird der Probendurchfluss auf 4,5 cm (entspricht 60%) verlängert.

Tabelle 12: Untersuchung verschiedener Materialien auf ihre Eignung als Sample Pad für einen modifizierten Schnelltest. Die Gesamtlänge des Teststreifens (inkl. Conjugate Pad, Absorbent Pad und Sample Pad) beträgt 7,5 cm.

Filtermaterialien	Durchfluss durch Teststreifen [in cm]
Glasfiberfilter 134460, Sartorius AG	0,0
Absorbent Pad, Whatman	0,0
Wattepad	1,0
aschefreie Rundfilter, MN	3,0
Filterpapier 595, Schleicher& Schüll	3,0
Küchenpapier, „Ja“	3,0
Cellulose-Membran 04-0262-3 R RA 10242, Außenseite oben, Sartorius AG	4,0
Cellulose-Membran 04-0262-3 R RA 10242, Innenseite oben, Sartorius AG	4,5

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Teststreifen liegt in der Variation der CN-Membran. Versuche mit der gröberporigen CN 90 Membran von Sartorius anstelle der bisher eingesetzten Standard-Membran CN 140 erbringen allerdings nur geringe Vorteile hinsichtlich des Probendurchflusses. Dieser erhöht sich auf ca. 5 cm (66%).

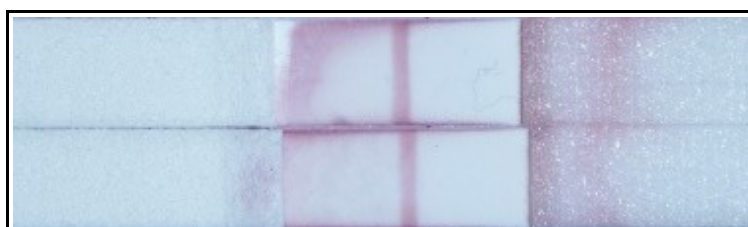


Abbildung 68: Ergebnis der Testdurchführung mit dem optimierten Testsystem mit gröberporiger, verkürzter Membran und Cellulose-Membran-Vorfilter. Untersucht wurden zwei Negativproben. Erkennbar ist auf dem oberen Teststreifen eine Schlierenbildung knapp unter dem Absorbent Pad.

Als weitere Optimierungsmaßnahme lässt sich schließlich auch die CN-Membran noch verkürzen. Im vorliegenden Fall wird der Membranstreifen am oberen und unteren Ende um jeweils 0,5 cm gekürzt, ohne dabei die Testzone auf den Streifen mit den immobilisierten Reagenzien zu beschädigen. Durch diese Modifikation kann schließlich ein Probenfluss bis in das Absorbent Pad erreicht werden. Außerdem kann durch diese Maßnahme die störende bräunliche Hin-

tergrundfärbung verringert werden, sodass erstmals eine visuelle Auswertung möglich ist (Abb. 68). Deutlich zeigt sich allerdings auch noch rötliche Schlierenbildung auf dem oberen Teststreifen. Trotz der verschiedenen Optimierungsansätze ist das Testsystem in diesem Zustand noch nicht für die geplante Anwendung geeignet. Es müssen folglich noch weitere Optimierungsbemühungen unternommen werden. Dennoch soll der letzte Optimierungsschritt - die Verkürzung der CN-Membran - bei der weiteren Versuchen zur Optimierung der Probenvorbereitung beibehalten werden.

Optimierung der Probenvorbereitung

Nach den fehlgeschlagenen Vorversuchen wird die ungefähre Partikelgröße des zerkleinerten Muschelfleisches mit dem beschriebenen TEM (Kap. 1.1) untersucht. Es wird festgestellt, dass die Größe der Partikel zwischen 130 - 350 μm beträgt und stark schwankt. Auch eine intensivere Behandlung mit dem Ultraturrax (5 min bei 24.000 rpm) verbesserte die Homogenität der Muschelproben nur unwesentlich auf 110 - 280 μm .

Eine weitere Möglichkeit der Probenvorbereitung bietet die Zentrifugation der Muschelproben. Durch ein Zentrifugieren der Proben könnte der Feststoffgehalt deutlich reduziert werden, da die störenden Muschelfleisch-Partikel abgeschieden würden. Der Test könnte dann mit dem Überstand der Zentrifugation durchgeführt werden. Auch bei der nun gewählten Probenvorbereitung wird nicht berücksichtigt, dass die Zentrifugation von Muschelproben kaum „feldtauglich“ wäre.

Die Vorbehandlung der Muschelproben mit einer Zentrifuge erfolgt bei einer maximalen Zentrifugengeschwindigkeit von 13000 rpm und bei Zentrifugationszeiten von 0 bis 30 min. Die Überstände der zentrifugierten Proben werden abgenommen und mit vorbereiteten Teststreifen untersucht.

Durch die Zentrifugation kann der Probendurchfluss durch die Teststreifen deutlich verbessert werden. Mit zunehmender Zentrifugationszeit der Proben nimmt auch die Durchlaufzeit der Probenflüssigkeit durch den Teststreifen stark ab. In ein bis zwei Minuten erreicht die Flüssigkeit das Absorbent Pad.

Eine unkonventionelle Methode bringt schließlich ein optimales Ergebnis hinsichtlich des Testerverlaufs und der Anwendbarkeit der Probenvorbereitung: Das Fleisch frischer Miesmuscheln wird aus den Schalen herausgelöst, abgetupft und mit Hilfe einer konventionellen Knoblauch-(hebel-)presse ausgepresst. Bereits bei der Vorbereitung ist erkennbar, dass die erhaltene Flüssigkeit

sigkeit einen sehr geringen Feststoffanteil aufweist. Bei der Bestimmung der Partikelgröße in der ausgepressten Muschelprobe wird zudem eine Verringerung der Partikelgröße auf 20-60 μm erreicht. Jeweils 200 μL dieser Probenflüssigkeit werden schließlich mit vorbereiteten Teststreifen untersucht.

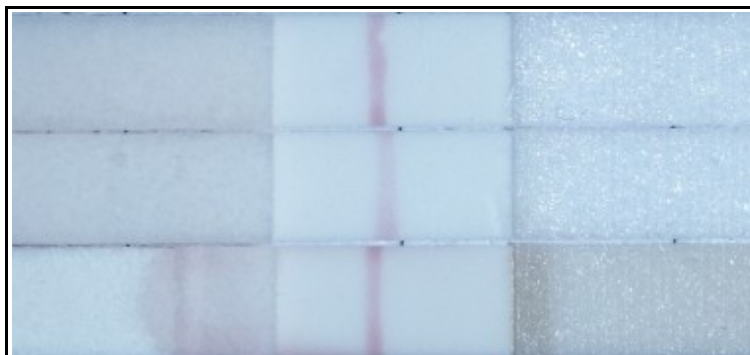


Abbildung 69: Kaum ein Unterschied ist zwischen einem Teststreifen zu erkennen, über den eine Nullprobe aus Pufferlösung gelaufen ist (oben), und einem Teststreifen, über den eine Muschelprobe nach Auspressen mit der Knoblauchpresse gelaufen ist (Mitte). Im Gegensatz zur vorhergehenden Probenvorbereitung (unten) ist keinerlei Braunfärbung mehr zu erkennen.

Schon während der Testdurchführung ist zu erkennen, dass die durch Auspressen mit der Knoblauchpresse gewonnene Muschelprobe ähnlich gut durch die Teststreifen läuft wie eine partikelfreie Probe aus KPP-Puffer V (vgl. Abb. 69). Nicht einmal mehr zu erkennen ist die leichte bräunliche Hintergrundfärbung der Teststreifen, die noch bei der vorhergehenden Vorbereitung der Muschelprobe auftrat. Auch läuft die Probe deutlich weiter durch den Teststreifen als vorher (vgl. Abb. 69, Mitte und unten).

Versuche zur Aufnahmefähigkeit der Teststreifen hinsichtlich verschiedener Probenflüssigkeiten zeigen im Anschluss daran, dass die Flüssigkeitsaufnahme der Streifen von den mit dem Ultraturrax vorbereiteten Muschelproben (ca. 20 $\mu\text{L}/15\text{ min}$) über die ausgepressten Muschelproben (50 $\mu\text{L}/15\text{ min}$) bis zu destilliertem Wasser (ca. 120 $\mu\text{L}/15\text{ min}$) deutlich ansteigt. Eingesetzt wurden jeweils 200 μL (= 200 mg) Probe. Weitere Versuche mit einer 1:3 mit KPP-Puffer V verdünnten Probe des ausgepressten Muschelfleisches (50 mg Muschelfleisch : 150 mg KPP-Puffer V) erbrachten eine Flüssigkeitsaufnahme von ca. 85 $\mu\text{L}/15\text{ min}$).

Insgesamt kann als Fazit festgehalten werden, dass eine Probenvorbereitung von Muschelproben für eine erfolgreiche Anwendung des Testsystems unerlässlich ist. Im Zusammenspiel mit den bereits vorher optimierten Teststrei-

fen lassen sich in Bezug auf den Probenfluss durch die Zentrifugation der Muschelproben oder durch die Vorbereitung der Proben mit einer Hebelpresse gute Ergebnisse erzielen. Als praktikabler für eine spätere Anwendung erweist sich die Probenvorbereitung mit der Hebelpresse.

MC-LR-Bestimmung in Muschelproben

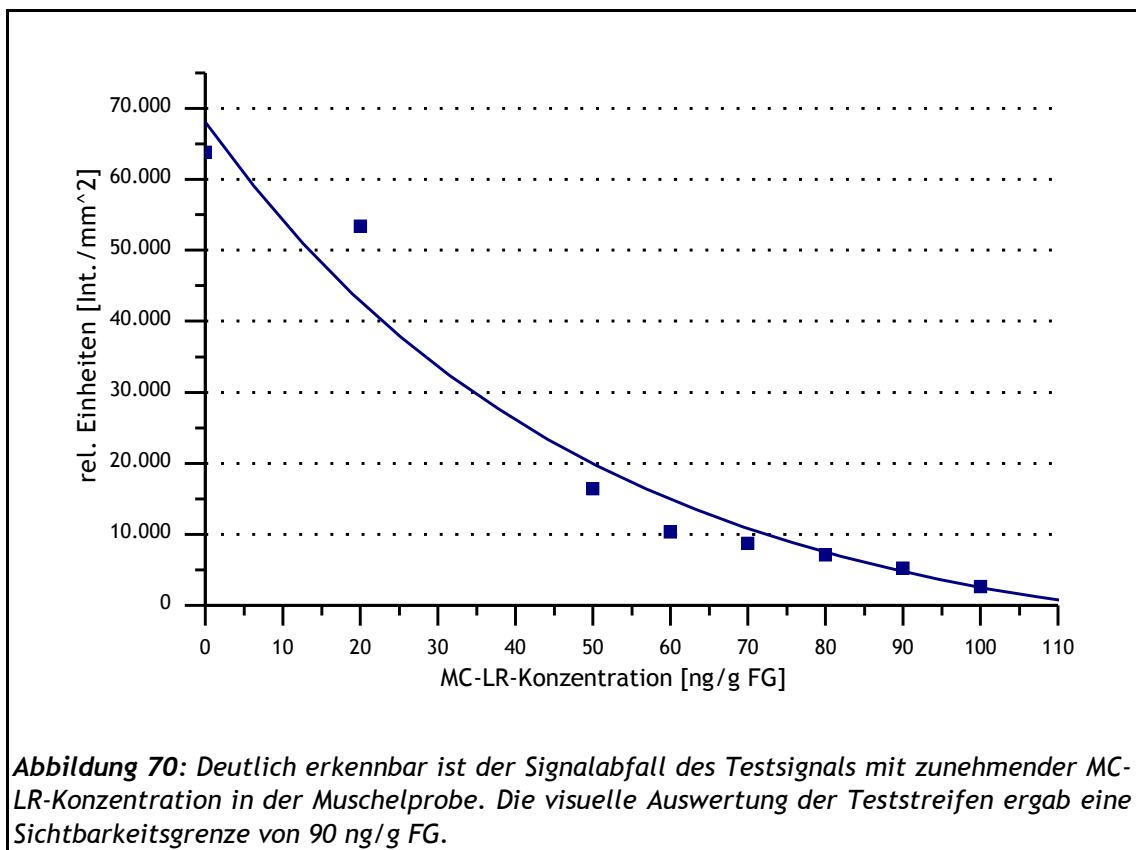
Zwar konnte in den bisher vorgestellten Arbeiten zum MC-LR-Nachweis die Aufnahme einer kontaminierten, weitgehend flüssigen Probe durch die Teststreifen soweit optimiert werden, dass ein Nachweis von MC-LR in *Mytilus edulis* möglich erscheint. Der Nachweis selbst aber steht bisher noch aus. Er soll in diesem Kapitel näher beleuchtet werden.

Zur Durchführung des MC-LR-Tests mit Muschelproben werden die vorhandenen Muscheln zunächst wie beschrieben vorbehandelt und die erhaltene Muschelflüssigkeit aufgeteilt. Ein Teil davon wird mit einem MC-LR-Standard definierter Konzentration (5 µg/mL in Methanol) dotiert und gut durchmischt, ein weiterer Teil wurde MC-LR-frei belassen. Aus diesen beiden Probenteilen werden im Anschluss Proben mit einer definierten von 0 - 100 ng/g FG MC-LR-Konzentration hergestellt. Jeweils 50 mg dieser Proben (= 50 µL) werden - wie im Vorkapitel beschrieben - mit 150 µL KPP-Puffer V (S. 179) verdünnt, gründlich vermischt und mit den zuvor hergestellten Teststreifen unter Standardbedingungen untersucht.

Deutlich erkennbar ist in der grafischen Auswertung der Versuchsreihe in Abb. 70 eine Abnahme der Testsignalintensität mit zunehmender MC-LR-Konzentration in der Muschelprobe. Oberhalb einer Konzentration von ca. 90 ng/g FG ist kein Signal mehr zu erkennen. In weiteren Versuchen konnte dieser Wert bestätigt werden. Er kann folglich als Nachweisgrenze für MC-LR in Muschelproben angesehen werden.

Die Empfindlichkeit des optimierten Schnelltestsystems für MC-LR in Muschelfleisch ist im Vergleich zu anderen analytischen Nachweismethoden sehr gut. Die Nachweisgrenzen beim unspezifischen Maus-Bioassay liegen beispielsweise im ppm-Bereich, die der bei [Wawra, 2005] erläuterten HPLC-Methode im hohen ppb-Bereich.

Bei allen bisherigen Versuchsreihen, in denen MC-LR in Muschelproben nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um nachgebildete „Realproben“. Sicherheit über die Funktionsfähigkeit des entwickelten Testsystems bei wirklich realen Proben kann jedoch nur durch eine Untersuchung ebendieser



erlangt werden. Daher sollen in der folgenden Versuchsreihe Muscheln untersucht werden, die auf „natürlichem“ Weg durch Fütterungsversuche mit MC-LR kontaminiert wurden. Dazu werden die zu untersuchenden Muscheln über 4 Tage mit einer *Microcystis aeruginosa*-Kultur (10^5 Zellen/mL) gefüttert. Anschließend werden die kontaminierten Muscheln mit optimierten und verkürzten Teststreifen untersucht. Da die Konzentration in der zu untersuchenden Muschelprobe nicht bekannt ist, wird die bei [Wawra, 2005] beschriebene HPLC-Methode als Referenzanalytik verwendet, um eine Aussage über die tatsächliche MC-LR-Konzentration zu erhalten.

Die Testdurchführung erfolgt nach den beschriebenen Bedingungen. Die Muscheln werden ausgepresst, die Muschelflüssigkeit mit KPP-Puffer V (S. 179) verdünnt und mit den verkürzten Teststreifen untersucht. Als Vergleich wird eine Nullprobe aus KPP-Puffer V parallel getestet.

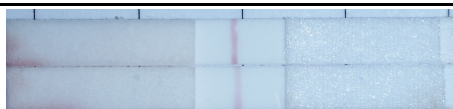


Abbildung 71: Zwar ist der Unterschied der Testlinienintensitäten zwischen der Nullprobe (oben) und der Muschelprobe (unten) nur gering, ein Vergleich mit früheren Versuchsreihen ergibt aber eindeutig eine MC-LR-Konzentration von 40-50 ng/g FG.

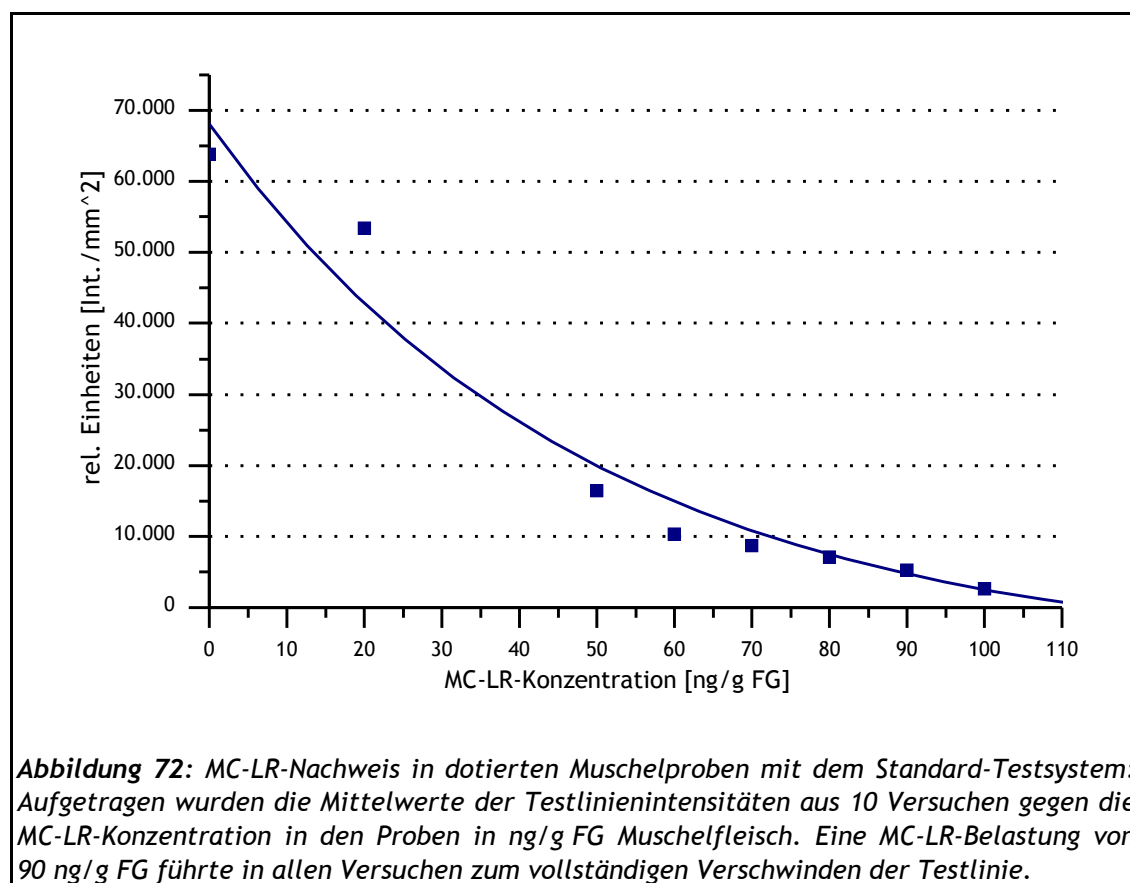
Auf den verwendeten Teststreifen ist eindeutig eine Abschwächung des Testsignals zu erkennen (Abb. 71). Zwar fällt der Unterschied nur gering aus, doch ein Vergleich mit früheren Versuchen ergibt, dass die untersuchten Muscheln tatsächlich mit MC-LR kontaminiert wurden. Die MC-LR-Konzentration kann durch die Vergleiche auf 40 - 50 ng/g FG festgelegt werden.

Mit der erwähnten HPLC-Methode konnte ebenfalls MC-LR in den Muscheln nachgewiesen werden. Es konnte eine Konzentration von 470 ng/g TG (Trockengewicht) ermittelt werden. Berücksichtigt man, dass für die HPLC-Nachweismethode die Muschelprobe gefriergetrocknet werden muss, muss für einen Vergleich der Ergebnisse aus Schnelltest und HPLC-Analyse das Verhältnis von Feuchtmasse und Trockenmasse einbezogen werden (1:10). Damit ergibt sich für beide Analysenmethoden ein nahezu gleiches Ergebnis, was die Eignung des Schnelltests für die Untersuchung realer Proben zeigt.

7.4.5 Zusammenführung der Ergebnisse aus den Anpassungen

Eine Schwierigkeit bei einer möglichen Kommerzialisierung des entwickelten und optimierten MC-LR-Schnelltests liegt darin, dass bisher zwei verschiedene Testsysteme für verschiedene Anwendungsgebiete vonnöten sind, die sich in ihrem Membranmaterial und vor allem in ihrer Länge unterscheiden. Aufgrund der hohen Partikelkonzentration in den Muschelproben konnten verwendbare Testergebnisse bisher nur mit einem verkürzten Teststreifen mit gröber-poriger Membran erzielt werden, der nicht den kommerziell erhältlichen Standard-Vorgaben entspricht. Für Herstellung und Vertrieb des MC-LR-Tests würde es einen zusätzlichen apparativen oder finanziellen Aufwand bedeuten, konfektionierte Klebekarten und Membranen einzukaufen bzw. diese selbst zu konfektionieren. Schon allein aus diesem Grund wäre es durchaus wünschenswert, den verkürzten, optimierten Schnelltest wieder auf den Standard-Test zurückzuführen. Durch die optimierte Probenvorbereitung mit zusätzlicher Verdünnung der Ausgangsprobe sollte es möglich sein, Muschelproben auch mit dem Standard-Test zu untersuchen. Diese Variation der Bedingungen wurde bisher nicht untersucht und soll in den folgenden Testreihen

betrachtet werden. Die Durchführung der Versuche erfolgt analog zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen. Allerdings werden die Muschelproben in diesem Fall mit den Standard-Teststreifen untersucht.



Wie in Abb. 72 zu sehen ist, lässt sich auch auf den Standard-Teststreifen ein Abfall der Testsignalintensität mit zunehmender MC-LR-Konzentration erkennen. Damit kann festgestellt werden, dass mit Hilfe der optimierten Probenvorbereitung Muschelproben auch mit dem Standard-Testsystem untersucht werden können. Die Herstellung eines speziellen Testformates bzw. die Verwendung konfektionierter Ausgangsmaterialien erübrigt sich so.

Bei einer Kommerzialisierung des Schnelltests müsste nach den vorliegenden Ergebnissen dem Anwender eine entsprechende Möglichkeit zur Probenvorbereitung gegeben werden. [Wawra, 2005] weist bereits auf die Möglichkeit einer einfachen Probenvorbereitung hin. Mittels einer Knoblauchpresse, einer Einwegpipette aus Plastik und eines mit einer definierten Menge KPP-Puffer gefüllten Mikroreaktionsgefäßes wäre in kurzer Zeit eine entsprechende Probe vorbereitet und könnte mit einem Teststreifen untersucht werden. Wie [Wawra, 2005] ermittelte, ist die Genauigkeit der Einwegpipetten ausrei-

chend für den MC-LR-Nachweis.

7.5 Fazit

Die Entwicklung des MC-LR-Tests kann als erfolgreich bewertet werden. Es konnte zunächst ein auf Standardmaterialien beruhendes Testsystem zum Nachweis von MC-LR in Pufferlösungen entwickelt werden. Mit Hilfe dieses Systems konnten grundlegende Erfahrungen gesammelt werden und verschiedene Optimierungsmöglichkeiten getestet werden. So konnten beispielsweise weitere Erfahrungen bei der Herstellung von Antikörper-Gold-Konjugaten gesammelt werden. Auch die Anwendung des Simplex-Algorithmus auf die Testoptimierung konnte untersucht werden. Das entwickelte Standardsystem konnte außerdem als Referenz in den anschließenden Anpassungen an reale Testbedingungen verwendet werden.

Als Fazit der Anpassung auf reale Testbedingungen lässt sich festhalten, dass das am Puffersystem entwickelte Schnelltestsystem sowohl auf Wasserproben als auch auf Muschelfleisch-Proben angewendet werden konnte. Während für eine Anwendung auf Wasserproben keine weitere Anpassung des Systems oder eine gezielte Probenvorbereitung notwendig waren, mussten für die Untersuchung von Muschelproben das Testsystem und/oder die Probenvorbereitung modifiziert werden. Am Ende der Arbeiten konnte ein optimiertes Schnelltestsystem für Proben mit hohen Feststoffgehalten aufgebaut werden und ebenso die Probenvorbereitung der Muschelproben mit Hilfe einer handelsüblichen Knoblauchpresse optimiert werden. Durch das Auspressen der Muscheln konnte der Feststoffgehalt der Proben deutlich reduziert werden, sodass das Standardtestsystem auch auf Muschelproben angewendet werden kann. Eine weitere Verwendung des optimierten Schnelltestsystems für Muscheln wurde damit hinfällig.

Mit der entwickelten, einfachen Probenvorbereitung konnte eine optische Sichtbarkeitsgrenze von 90 ng MC-LR pro Gramm Muschel-Frischgewicht etabliert werden. Wie bereits beschrieben, werden für Lebensmittel und Trinkwasser Grenzwerte von 1 µg/kg bzw. 1 µg/mL für das Algentoxin angegeben. Die Teststreifen funktionieren in diesen Konzentrationsbereichen problemlos und reproduzierbar. Gerade bei der Untersuchung von Muschelproben sind die Abweichungen in den Intensitätsverläufen der Testsignale kaum wahrnehmbar. Demgegenüber erscheint die derzeit von der Europäischen Kommission vorgeschriebene Referenzmethode zur Analyse von Algengiften in Muscheln -

der Maus-Bioassay - deutlich ungeeigneter. Seine schlechte Reproduzierbarkeit, seine unzuverlässigen Untersuchungsergebnisse und nicht zuletzt ethische Gründe lassen einen Ersatz dieser Methode wünschenswert erscheinen.

7.6 Ausblick

Nach den positiven Erfahrungen bei der Anwendung des entwickelten Schnelltestsystems auf reale Wasser- und Muschelproben könnte in weiteren Studien auch die Anwendung auf andere Realproben wie Fisch-Innereien oder Krebsfleisch untersucht werden, um das Anwendungsgebiet noch erweitern zu können. Mit Fisch-Innereien wurden bereits erste Versuche unternommen, doch bietet dieses Themengebiet noch viel Potenzial für weitere Arbeiten.

Schließlich könnte auch eine Anpassung des Schnelltestsystems für andere Algentoxine im Mittelpunkt künftiger Untersuchungen stehen. Bereits angedacht wurde während des MC-LR-Projektes die Entwicklung eines Saxitoxin-Tests und eventuell eine Kombination beider Tests auf einem Teststreifen.

Ein Schnelltest für Algentoxine könnte beispielsweise in der Fischindustrie und in der Lebensmittelindustrie angewendet werden. Er könnte Kontaminationen von marinen Lebensmitteln schon bei der Anlandung eines Fanges zeigen, die Kontaminationen aus der Produktionskette entfernen und damit größere Schäden für Konsumenten abwenden. Ein großer Bedarf an schnellen und zuverlässigen Nachweismethoden für Algentoxine ist weltweit gegeben. Der in diesem Bereich bisher vorgeschriebene Maus-Bioassay kann, wie beschrieben, diese Anforderungen nicht erfüllen. Er könnte in Zukunft durch den in dieser Arbeit entwickelten immunanalytischen Schnelltest unterstützt bzw. ersetzt werden.

Neben diesen Überlegungen stellt auch die Untersuchung weiterer Wasserproben ein interessantes Arbeitsgebiet dar. Auch in diesem Gebiet ist bisher keine schnelle und einfache Analytik etabliert. Gerade aber die Untersuchung von potenziell Algentoxin-belasteten Badegewässern bietet ein nicht nur kommerziell beachtenswertes Einsatzgebiet für den Schnelltest. Auch bei einer solchen Anwendung wären weitere Studien in diesem Bereich vor der Einführung eines zuverlässigen MC-LR-Wassertests vonnöten.

Da der Schnelltest bisher in seiner Haltbarkeit auf 3 bis 4 Monate begrenzt ist, sind auch diesbezüglich noch Entwicklungsmöglichkeiten vorhanden. Außerdem müsste bei einer eventuellen Markteinführung die Verpackung an diesen Schnelltest angepasst werden. Vor dem Vermarkten dieses Produktes

müssten die Materialkosten, Produktionskosten und Gerätekosten bestimmt und eine umfangreiche Wirtschaftlichkeits- und Kostenanalyse durchgeführt werden. Aufgrund dieser Zahlen müsste entschieden werden, ob und zu welchem Preis dieses immunanalytische Schnelltestsystem auf den Markt gebracht werden kann.

V. Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten viele grundlegende Erkenntnisse über die Entwicklung von immunchromatographischen Schnelltestsystemen gesammelt werden. Gegen Ende der praktischen Arbeiten konnten funktionierende Schnelltests der beiden am weitesten verbreiteten Testformate - Sandwich-GLISA und kompetitiver GLISA - vollständig aus eigenen Mitteln entwickelt werden. Damit wurde eine solide Wissensbasis zusammengetragen, die als Grundlage für weitere Forschungs- und Entwicklungsvorhaben in diesem Bereich dienen kann. Die Entwicklung von Tests für andere Analyte sollte dann problemloser und schneller erfolgen können.

Basierend auf verschiedenen Vorarbeiten ist es in dieser Arbeit gelungen, zwei funktionierende immunchromatographische Schnelltests für die Analyse toxinhaltiger flüssiger Proben zu entwickeln, die im Fall des MC-LR-Tests sogar schon erfolgreich auf reale Proben angewendet werden konnten. In beiden Fällen konnten Toxin-Konzentrationen im ppb-Bereich nachgewiesen werden, was durchaus als Erfolg zu werten ist.

Verschiedene Gründe erforderten während der Arbeiten an dem SEB-Schnelltestsystem ein hohes Maß an Flexibilität und Einschränkungen hinsichtlich der Versuchsplanung. Membran- und Vliesmaterialien standen ebenso wie Antikörper, Toxin und kolloide Goldlösung nur in begrenztem Umfang zur Verfügung. Das verhinderte die vollständige systematische Erschließung des gesamten Themengebietes.

Das direkte Sandwich-GLISA-Schnelltestsystem für SEB funktioniert reproduzierbar in einem Bereich von 25 ng/mL bis 10.000 bzw. 25.000 ng/mL SEB. Das Toxin konnte in allen Proben innerhalb dieses Bereiches einwandfrei nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprechen hinsichtlich des Intensitätsverlaufes der Testlinien dem im Theoretischen Teil beschriebenen Bild für Sandwich-Assays.

Während der Entwicklung des SEB-Tests wurden auch Membranmaterialien, die ursprünglich nicht für LFD-Anwendungen konzipiert wurden, erfolgreich in Schnellteststreifen integriert. Der Einsatz feinerporiger Membranen bietet sich an, wenn bei den eingesetzten Antikörpern längere Reaktionszeiten vonnöten sind. So lassen sich vielleicht auch noch eine große Zahl an Antikörpern und Antigenen für LFD-Tests erschließen, die bisher aufgrund langer Reakti-

onszeiten für eine Nutzung nicht in Frage kommen. Es wäre durchaus interessant, entsprechende Studien im Bereich der Membranherstellung zu unternehmen und zu untersuchen, inwieweit die Herstellung feinerporiger Membranmaterialien für LFD-Anwendungen möglich ist.

Insgesamt wäre es wünschenswert, die Arbeiten an dem Testsystem fortzusetzen, um die Ergebnisse vor allem hinsichtlich der Sensitivität des Tests zu optimieren. Mit den verwendeten Materialien sollte es durchaus möglich sein, SEB-Konzentrationen im kleinen ppb-Bereich bzw. sogar im ppt-Bereich zu detektieren. Die Untersuchung realer Proben (Nahrungsmittel, Stuhl, Erdreich etc.) mit dem entwickelten Testsystems steht noch aus. Gerade Erkenntnisse aus solchen Versuchen sind aber eine wichtige Voraussetzung für einen kommerziell verwertbaren, standardmäßigen Einsatz eines SEB-Schnelltests. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bieten für derartige Bemühungen eine solide, erfolgversprechende Basis.

Die Entwicklung des kompetitiven MC-LR-GLISA-Systems kann ebenfalls als erfolgreich bewertet werden. Es konnte zunächst ein auf Standardmaterialien beruhendes Testsystem zum Nachweis von MC-LR in Pufferlösungen entwickelt werden, mit dessen Hilfe grundlegende Erfahrungen gesammelt werden und verschiedene Optimierungsmöglichkeiten ausprobiert werden konnten.

Das am Puffersystem entwickelte Schnelltestsystem konnte sowohl auf Wasserproben als auch auf Muschelfleisch-Proben angewendet werden. Während für eine Anwendung auf Wasserproben keine weitere Anpassung des Systems oder eine gezielte Probenvorbereitung notwendig waren, musste für die Untersuchung von Muschelproben die Probenvorbereitung modifiziert werden. Am Ende der Arbeiten konnte ein optimiertes Schnelltestsystem für Proben mit hohen Feststoffgehalten aufgebaut werden, das eine einfache und optimierte Probenvorbereitung beinhaltet. Mit dem optimierten Testsystem konnte eine optische Sichtbarkeitsgrenze von 90 ng MC-LR pro Gramm Muschel-Frischgewicht etabliert werden. Die Teststreifen funktionierten in diesen Konzentrationsbereichen problemlos und reproduzierbar.

Nach den positiven Erfahrungen bei der Anwendung des entwickelten Schnelltestsystems auf reale Wasser- und Muschelproben könnte in weiteren Studien auch die Anwendung auf andere Realproben wie Fisch-Innereien oder Krebsfleisch untersucht werden, um das Anwendungsgebiet noch erweitern zu

können. Auch eine Anpassung des Schnelltestsystems für andere Algentoxine könnte im Mittelpunkt künftiger Untersuchungen stehen.

Neben diesen Überlegungen bietet auch die Untersuchung von Wasserproben ein interessantes Arbeitsfeld. Auch in diesem Gebiet ist bisher keine schnelle und einfache Analytik etabliert. Gerade aber die Untersuchung von potenziell Algentoxin-belasteten Badegewässern bietet ein nicht nur kommerziell beachtenswertes Einsatzgebiet für den Schnelltest.

Da der Schnelltest bisher in seiner Haltbarkeit auf 3 bis 4 Monate begrenzt ist, sind auch diesbezüglich noch Entwicklungsmöglichkeiten vorhanden. Außerdem müsste bei einer eventuellen Markteinführung die Verpackung an diesen Schnelltest angepasst werden.

Durchaus erfolgreich gestaltete sich die Verwendung des Simplex-Algorithmus zur Optimierung der Testkomponenten in beiden Testsystemen. Es wäre sicherlich interessant, umfangreichere Versuchsreihen mit Hilfe dieses Werkzeuges zu realisieren. So ließen sich auch weitere Faktoren in den Simplex einbinden. pH-Wert und Pufferkonzentration wären dafür nur zwei Beispiele. Neben BSA und Tween 20® könnten die Auswirkungen weiterer Detergenzien wie Triton® oder verschiedener Polyethylenglykole (PEG) untersucht werden. Denkbar wäre auch die Verwendung anderer Algorithmen und ein Vergleich der Methoden miteinander anhand der Schnelltestentwicklung.

VI. Literatur

- Alchemy (2003). Product Information Sheet - Gold Conjugate with polyclonal anti-SEB. Dundee, Alchemy Laboratories.
- Alchemy (2004). Product Information Sheet - Gold Conjugate with monoclonal anti-SEB. Dundee, Alchemy Laboratories.
- Bangs (1999a). Adsorption to Microspheres. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs (1999b). Lateral Flow Tests. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs (2002a). Covalent Coupling. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs (2002b). Working with Microspheres. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs (2003a). Microsphere Size Standards. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs (2003b). Microsphere Sizing. Bangs Laboratories TechNotes, Bangs Laboratories.
- Bangs, L. B., Meza, M. B. (1995). "Microspheres." IVD Technology Magazine(03/1995).
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2003). Biochemie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- BfR (2005). Maus-Bioassay als Standard-Referenzmethode für die routinemäßige Analyse von Algengiften in Muscheln nicht geeignet. B. f. Risikobewertung.
- Biodot (2005). Product Informations 2005. Irvine, Biodot Inc.
- Bryskier, A. (2002). "Bacillus anthracis and antibacterial agents." Clin Microbiol Infect **8**(8): 467-78.
- Casti, J. L. (1996). Die großen Fünf : mathematische Theorien, die unser Jahrhundert prägten. (a. d. amerikan.: G. Menzel), Basel, Birkhäuser.
- CDC's Division of Parasitic Diseases (2003). "Fact Sheet - Schistosomiasis." Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta.
- Chandler, J., Robinson, N., Whiting, K. (2000). "The place of gold in rapid tests." IVD Technology Magazine **6**(2): 37-49.
- Chandler, J., Robinson, N., Whiting, K. (2001). "Handling false signals in gold-

- based rapid tests." IVD Technology Magazine 7(2): 34.
- CLI (2001). "The role of diagnostic tests in reducing healthcare costs." Clinical Laboratory International.
- Collins, W. S., 2nd, J. F. Metzger and A. D. Johnson (1972). "A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin." J Immunol 108(3): 852-6.
- Cunha, B. A. (2002). "Anthrax, tularemia, plague, ebola or smallpox as agents of bioterrorism: recognition in the emergency room." Clin Microbiol Infect 8(8): 489-503.
- D. S. Moss, C. N. The Superantigen Web Catalogue and Database.
- Dawson, R. M. (1998). "The toxicology of microcystins." Toxicon 36(7): 953-62.
- EDMA (2003). European IVD market estimates 2003. Brüssel, EDMA - European Diagnostic Manufacturers Association.
- EDMA (2006). EDMA-Homepage. Brüssel, EDMA - European Diagnostic Manufacturers Association.
- Ekins, R. (1991). Immunoassay design and optimisation. Principles and Practice of Immunoassay. C. P. Price, Newman, D. J. Basingstoke (UK), Macmillan Publishers.
- Fontal, O. I., M. R. Vieytes, J. M. Baptista de Sousa, M. C. Louzao and L. M. Botana (1999). "A fluorescent microplate assay for microcystin-LR." Anal Biochem 269(2): 289-96.
- Freed, R. C., M. L. Evenson, R. F. Reiser and M. S. Bergdoll (1982). "Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods." Appl Environ Microbiol 44(6): 1349-55.
- Greenfield, R. A., B. R. Brown, J. B. Hutchins, J. J. Iandolo, R. Jackson, L. N. Slater and M. S. Bronze (2002a). "Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism." Am J Med Sci 323(6): 326-40.
- Greenfield, R. A., D. A. Drevets, L. J. Machado, G. W. Voskuhl, P. Cornea and M. S. Bronze (2002b). "Bacterial pathogens as biological weapons and agents of bioterrorism." Am J Med Sci 323(6): 299-315.
- Greenfield, R. A., B. D. Lutz, M. M. Huycke and M. S. Gilmore (2002c). "Unconventional biological threats and the molecular biological response to biological threats." Am J Med Sci 323(6): 350-7.
- Grunow, R. and E. J. Finke (2002). "A procedure for differentiating between the intentional release of biological warfare agents and natural outbreaks of disease: its use in analyzing the tularemia outbreak in Kosovo in 1999

- and 2000." Clin Microbiol Infect **8**(8): 510-21.
- Havlak, R., S. E. Gorman and S. A. Adams (2002). "Challenges associated with creating a pharmaceutical stockpile to respond to a terrorist event." Clin Microbiol Infect **8**(8): 529-33.
- Henderson, K. M., Stewart, J. (2000). "A dipstick immunoassay to rapidly measure serum oestrone sulfate concentrations in horses." Reproduction, Fertility and Development(12): 183-189.
- Hetzelt, H. A. (2005). Entwicklung eines Biosensors zum simultanen Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen. Tierärztlichen Fakultät. München, Ludwig-Maximilians-Universität München. **Dr. vet. med.**
- HyTest (2004). Antibody Data Sheet, HyTest.
- Johnson, H. M., J. A. Bukovic, P. E. Kauffman and J. T. Peeler (1971). "Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay." Appl Microbiol **22**(5): 837-41.
- Johnson, H. M., J. A. Bukovic and P. E. Kauffmann (1973). "Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food." Appl Microbiol **26**(3): 309-13.
- Jones, K. D. (1999a). "Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes, Part 1: Principles." IVD Technology Magazine **5**(2): 32-41.
- Jones, K. D. (1999b). "Troubleshooting protein binding in nitrocellulose membranes, Part 2: Common Problems." IVD Technology Magazine **5**(3): 26-35.
- Jones, K. D. (2002a). "Conjugate release materials in lateral-flow assays." Med Device Technol **13**(4): 16-8.
- Jones, K. D. (2002b). Nitrocellulose membranes - optimisation and troubleshooting. Whatman International Diagnostics Support Conference. München, Whatman International.
- Jones, K. D., Haithi, P., Hopkins, A. K. (2002c). The influence of conjugate release materials on quantitative lateral flow assays.
- Klewitz, T. (2000). Proteinbindung an Diagnostikmembranen. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Diplom-Chemiker**.
- Klewitz, T. (2004). Entwicklung eines quantitativen Lateral-Flow-Immunoassays zum Nachweis von Analyten in geringsten Konzentrationen. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Dr. rer. nat.**
- Kleppmann, F. (2006). Taschenbuch Versuchsplanung : Produkte und Prozesse optimieren. 4. überarb. Aufl., München, Hanser.

- Kondo, F., Y. Ito, H. Oka, S. Yamada, K. Tsuji, M. Imokawa, Y. Niimi, K. Harada, Y. Ueno and Y. Miyazaki (2002). "Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column." Toxicon **40**(7): 893-9.
- Kondo, F., H. Matsumoto, S. Yamada, N. Ishikawa, E. Ito, S. Nagata, Y. Ueno, M. Suzuki and K. Harada (1996). "Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers." Chem Res Toxicol **9**(8): 1355-9.
- Kondo, F., H. Matsumoto, S. Yamada, K. Tsuji, Y. Ueno and K. Harada (2000). "Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water." Toxicon **38**(6): 813-23.
- Kopp, S. (2003). Aktuelle Entwicklungen in der Algentoxinanalytik. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Bachelor of Science**.
- Krakauer, T. (1999). "Immune response to staphylococcal superantigens." Immunol. Res. **20**(2): 163-73.
- Kroll, S. (2004). Immunologische Toxinanalyse - Markierung von Antikörpern und deren Einsatz in Querfließ-Testformaten. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Master of Science**.
- Krüger, C. (2001). Funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen bakteriellen Superantigenen und bovinen neutrophilen Granulozyten. Arbeitsgruppe Immunologie. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. **Dr. vet. med.**
- Kubo, T., K. Hosoya, Y. Watabe, N. Tanaka, T. Sano and K. Kaya (2004). "Recognition of hepatotoxic homologues of Microcystin using a combination of selective adsorption media." J Sep Sci **27**(4): 316-24.
- LaborPraxis (2005). "Algengifte in Muscheln besser nachweisen." LaborPraxis(5).
- Lamotte, R. (2002). Assay Development on a Laboratory Scale. Whatman International Diagnostics Support Conference. München, Whatman International.
- Lawrence, J. F. and C. Menard (2001). "Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography." J Chromatogr A **922**(1-2): 111-7.
- Lonnberg, M. and J. Carlsson (2001). "Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner." Anal Biochem **293**(2): 224-31.

- Lottspeich, F., Ed. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Marrack, P. and J. Kappler (1990). "The staphylococcal enterotoxins and their relatives." Science **248**(4956): 705-11.
- McDermott, C. M., R. Feola and J. Plude (1995). "Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern Wisconsin by a new immunoassay technique." Toxicon **33**(11): 1433-42.
- Mennicke, S. Versuchsplanung, S. Mennicke. **2006**.
- Merck (2004). Microbiology Rapid Testing - Duopath® GLISA Verotoxins test procedure. Darmstadt, Merck KGaA. **2006**.
- Meza, M. (2001). Microsphere Characteristics for Rapid Test Development. Bangs Laboratories Diagnostic Support 2001. Chicago, Bangs Laboratories.
- Millipore (1998). A short guide - Developing Immunochromatographic test strips. Bedford, Millipore Corp.
- Minolta (2002). Minolta Dimage 7i - Bedienungsanleitung, Minolta Co., Ltd.
- Miyai, K. (1991). Classification of immunoassay. Principles and Practice of Immunoassay. C. P. Price, Newman, D. J. Basingstoke (UK), Macmillan Publishers.
- Morissette, C., J. Goulet and G. Lamoureux (1991). "Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese." Appl Environ Microbiol **57**(3): 836-42.
- Morissette, C., Goulet, J., Lamoureux, G. (1990a). "Production of avid rabbit antibodies against staphylococcal enterotoxins A and B." Journal of Food Protection **53**(9): 782-785.
- Morissette, C., Goulet, J., Lamoureux, G. (1990b). "Simple and rapid inhibition enzyme-immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B in foods." Journal of Food Protection **53**(10): 834-840.
- Navas, E. (2002). "Problems associated with potential massive use of antimicrobial agents as prophylaxis or therapy of a bioterrorist attack." Clin Microbiol Infect **8**(8): 534-9.
- Newson, A. (2002). Optimisation of Conjugate Release Materials for Lateral Flow Immunoassays. Whatman International Diagnostics Support. München, Whatman International.
- Noack, U., Winkelmann, G. (2005). Nachweis von Microcystin-LR mittels HPLC. H. Stückmann. Sarstedt, Dr. U. Noack-Laboratorien.

- Nulens, E. and A. Voss (2002). "Laboratory diagnosis and biosafety issues of biological warfare agents." Clin Microbiol Infect **8**(8): 455-66.
- O'Farrell, B. (2005a). New Approaches in rapid testing. Schleicher & Schuell Workshop - Theory and Practice of Rapid Immunodiagnostic Test Development and Manufacture. Amsterdam, Schleicher & Schuell.
- O'Farrell, B. (2005b). Theory of Colloidal Gold Manufacture and Conjugation. Schleicher & Schuell Workshop - Theory and Practice of Rapid Immunodiagnostic Test Development and Manufacture. Amsterdam, Schleicher & Schuell.
- O'Farrell, B. (2005c). Trouble Shooting Guide - Pitfalls and Problems. Schleicher & Schuell Workshop - Theory and Practice of Rapid Immunodiagnostic Test Development and Manufacture. Amsterdam, Schleicher & Schuell.
- Papageorgiou, A. C., H. S. Tranter and K. R. Acharya (1998). "Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors." J Mol Biol **277**(1): 61-79.
- Park, C. E., Akhtar, M., Rayman, M. K. (1992). "Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods." Appl Environ Microbiol **58**(8): 2509-12.
- Park, C. E., Warburton, D., Laffey, P. J. (1996a). "A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods by an enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN)." Int J Food Microbiol **29**(2-3): 281-95.
- Park, C. E., Warburton, D., Laffey, P. J., M. Akhtar, K. Catherwood, C. Crawford, S. Durzi, R. Foster, C. Fox, L. Gour, K. Jessett, M. Langridge, E. Mann, J. Fawcett, A. Morrow, J. Oggel, L. Peticlerc, U. Purvis and W. Zandstra (1996b). "A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods with an enzyme immunoassay kit (TECRA)." JOURNAL OF FOOD PROTECTION **59**(4): 390-397.
- Place, J. F., Bicker, U. (2001/2002). "In-vitro testing: diagnostics and other medical applications." Hospital Healthcare Europe(2001/2002).
- Pschyrembel, W. (1999). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch als CD-ROM. Berlin, New York, W. de Gruyter.
- R. Breuer, I. H., G. Trageser, Ed. (2001). Das Immunsystem. Spektrum der Wissenschaft spezial. Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft Verlag.
- Ragnar Norrby, S. (2002). "Bioterrorism: how serious is the threat?" Clin Micro-

- biol Infect **8**(8): 448-9.
- Ramanan, S., J. Tang and A. Velayudhan (2000). "Isolation and preparative purification of microcystin variants." J Chromatogr A **883**(1-2): 103-12.
- Rebmann, R. (1999). Gifte.de - Staphylokokken-Enterotoxin B. **2006**.
- Rennesens (2006). CardioDetect - Produktbeschreibung. Berlin.
- Robinson-Dunn, B. (2002). "The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism." Arch Pathol Lab Med **126**(3): 291-4.
- Roffey, R., K. Lantorp, A. Tegnell and F. Elgh (2002a). "Biological weapons and bioterrorism preparedness: importance of public-health awareness and international cooperation." Clin Microbiol Infect **8**(8): 522-8.
- Roffey, R., A. Tegnell and F. Elgh (2002b). "Biological warfare in a historical perspective." Clin Microbiol Infect **8**(8): 450-4.
- Rusnak, J. M., M. Kortepeter, R. Ulrich, M. Poli, E. Boudreau (2004). "Laboratory Exposures to Staphylococcal Enterotoxin B." Emerging Infectious Diseases **9**(10): 1544-9.
- Russmann, H. (2003). "Toxine - Biogene Gifte und potenzielle Kampfstoffe." Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz(11).
- Schantz, E. J., W. G. Roessler, J. Wagman, L. Spero, D. A. Dunnery and M. S. Bergdoll (1965). "Purification of staphylococcal enterotoxin B." Biochemistry **4**(6): 1011-6.
- Schmid, G. and A. Kaufmann (2002). "Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism." Clin Microbiol Infect **8**(8): 479-88.
- Sossna, M. (2006). Membranherstellung im Verdunstungsverfahren. Hannover.
- Spero, L., D. Stefanye, P. I. Brecher, H. M. Jacoby, J. E. Dalidowicz and E. J. Schantz (1965). "Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin B." Biochemistry **4**(6): 1024-30.
- Stückmann, H. (2002). Entwicklung eines immunochemischen Dipstick-Sensors. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Diplom-Chemiker**.
- Tegnell, A., B. Wahren and F. Elgh (2002). "Smallpox--eradicated, but a growing terror threat." Clin Microbiol Infect **8**(8): 504-9.
- Tempelman, L. A., K. D. King, G. P. Anderson and F. S. Ligler (1996). "Quantitating staphylococcal enterotoxin B in diverse media using a portable fiber-optic biosensor." Anal Biochem **233**(1): 50-7.

- Tippkötter, N. (2005). Markierte Antikörper in der Immunanalytik - Bindung von Antikörpern auf Kolloidoberflächen und deren Anwendung in Querfluss-Testformaten für den Toxinnachweis. Fachbereich Chemie. Hannover, Universität Hannover. **Diplom-Chemiker**.
- Tsutsumi, T., S. Nagata, A. Hasegawa and Y. Ueno (2000). "Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water." Food Chem Toxicol **38**(7): 593-7.
- Uptima (2006). Assay Procedures. BC Assay: Protein Quantitation Kit, Uptima.
- van Dam, G. J., Wichers, J. H., Ferreira, T. M., Ghati, D., van Amerongen, A., Deelder, A. M. (2004). "Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen." J Clin Microbiol **42**(12): 5458-61.
- VDGH (2006). VDGH-Homepage. Frankfurt, VDGH - Verband der Diagnostika-Industrie.
- Wang, Z., J. Lee, A. R. Cossins and M. Brust (2005). "Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes." Anal Chem **77**(17): 5770-4.
- Whatman Protein Binding on Nitrocellulose. Troubleshooting Flowcharts. Maidstone, UK, Whatman International Ltd.
- Wikipedia (2006). Haupthistokompatibilitätskomplex, Wikimedia.
- Wikipedia (2006). Schistosomiasis, Wikimedia.
- Wikipedia (2006). Superantigen, Wikimedia.
- Wild, D. (1994a). The Immunoassay Handbook. Basingstoke, The Macmillan Press Ltd.
- Wild, D. (1994b). Products - Introduction. The Immunoassay Handbook. D. Wild. Basingstoke, The Macmillan Press Ltd.: 137-143.
- Zeck, A. (2001). Entwicklung von immunanalytischen, chromatographischen und massenspektrometrischen Methoden zur Bestimmung cyanobakterieller Hepatotoxine (Microcystine und Nodularine). Fakultät für Chemie. München, Technische Universität München. **Dr. rer. nat.**

VII. Anhang

1. Arbeitsanweisungen und Herstellungsanweisungen

1.1 Vorbereitende Arbeiten zur Herstellung der Teststreifen

1.1.1 Vorbereitung der Reaktionsgefäße

Mikroreaktionsgefäße

Die zur Konjugation verwendeten Mikroreaktionsgefäße müssen vor der Konjugation vorbehandelt werden, da die Plastikoberfläche dazu neigt, das Antikörper-Gold-Konjugat zu adsorbieren, sodass sich die Partikel irreversibel an den Gefäßwandungen abscheiden. Dieses lässt sich durch eine BSA-Beschichtung der Reaktionsgefäße verhindern.

- Die Mikroreaktionsgefäße werden daher zunächst jeweils halb mit einer 1 %igen (w/w) BSA-Lösung in dest. Wasser gefüllt und für min. 3 Stunden bei 60 °C im Laborschüttler geschüttelt.
- Danach werden Gefäße entleert und über Nacht im Trockenschrank bei 40 °C getrocknet.

Glasgefäße

Die zur Herstellung der Konjugate verwendeten Glasgefäße (z.B. zur Einstellung des pH-Wertes der kolloiden Gold-Lösung) müssen vor der Verwendung mit Königswasser (1:3 Vol.-Teile Salpetersäure (HNO₃) zu Salzsäure (HCl)) gründlich gereinigt werden, um mögliche Ablagerungen auf den Gefäßwandungen zu verhindern. Selbst zurückgebliebene Gold-Partikel werden durch Königswasser zu löslicher Tetrachlorogold(III)-säure H[AuCl₄] oxidiert. Nach der Reinigung werden die Glasgefäße gründlich mit bidest. Wasser ausgespült und gründlich getrocknet.

1.1.2 Imprägnierung der Conjugate Pads

- Reemay 2040-Polyestervlies (S. 181) wird in 10 Streifen á 25x280 mm geschnitten.
- 500 mL Imprägnierungspuffer I (S. 177) werden in einem 1 L Becherglas vorgelegt.
- Die vorbereiteten Vliesstreifen werden aufeinander gelegt, leicht eingerollt und entlang der Glaswandungen in das Becherglas gelegt.
- Das Becherglas wird für 3-4 h bei RT auf einem Laborschüttler bei ca. 100 rpm) geschüttelt.

- Nach der Imprägnierung werden die Vliesstreifen auf einer glatten Oberfläche ausgebreitet für ca. 12-14 h bei RT getrocknet. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Vliesstreifen waagerecht liegen, um eine gleichmäßige Imprägnierung zu gewährleisten.
- Nach der Imprägnierung stehen die Streifen für die weiteren Fertigungsschritte zur Verfügung.

1.1.3 Herstellung der Teststreifen

- Zunächst wird der mittlere Schutzstreifen einer GL-187-Plastikkarte abgelöst und der vorbereitete Membranstreifen möglichst exakt parallel zur Ober-/Unterkante der Plastikkarte aufgebracht. Bei manuellem Aufkleben sollten Einweg-Latex- oder Baumwollhandschuhe verwendet werden, um eine Verschmutzung durch Hautpartikel oder Schweiß und eine Beschädigung z.B. durch spitze Fingernägel der CN-Membran zu vermeiden.
- Die aufgeklebte Membran sollte entweder mit den Fingern oder mit einer entsprechenden kleinen Rolle leicht angedrückt werden.
- Der untere Schutzstreifen wird von der Plastikkarte abgelöst.
- Das vorbereitete Conjugate Pad wird so auf die Plastikkarte aufgebracht, dass das Pad die bereits aufgeklebte Membran auf ganzer Länge um ca. 1 mm überlappt.
- Auch das Conjugate Pad wird mit den Fingern oder einer kleinen Rolle leicht angedrückt.
- Der obere Schutzstreifen wird von der Plastikkarte abgelöst.
- Das Absorbent Pad wird, ebenfalls ca. 1 mm überlappend, an der Oberkante der Membran angebracht und angedrückt.
- Die zusammengefügte Testkarte wird für eine Stunde mit einem gleichmäßig verteilten Gewicht von ca. 3 kg gepresst, um den druckempfindlichen Klebstoff auf den Plastikkarten entsprechend zu aktivieren.
- Die Streifen werden je nach Ausstattung mit einer manuellen Schlagschere oder einem speziellen Cutter auf eine Breite von 5 mm geschnitten.

1.1.4 Applikation des Konjugates

- Das gewünschte Volumen der nach den entsprechenden Vorschriften hergestellten Konjugate (vgl. Kap. 1.2.1 und Kap. 1.2.2) wird mit einer variablen Mikroliterpipette mittig im oberen Drittel des Conjugate Pads aufgetragen.
- Die vorbereiteten Teststreifen können nach ca. 30 min Trocknungszeit für Tests verwendet werden.

1.2 Testsystem für *Staphylococcus* Enterotoxin B in wässrigen Proben

1.2.1 Herstellung des Konjugates

Die Angaben gelten für einen Reaktionsansatz von 1,15 mL und ca. 50 µL unverdünntes Konjugat:

- Ein ausreichendes Volumen der kolloiden Gold-Lösung wird mit wenigen Tropfen verdünnter Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert von ca. pH 6,5 bis pH 7 eingestellt.
- 1 mL der eingestellten kolloiden Lösung wird in einem BSA-beschichteten Mikroreaktionsgefäß vorgelegt.
- Es wird eine Antikörper-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL anti-SEB_{Maus}, Klon S643, nach Herstellerangaben angesetzt.
- 21 µL (Verlust durch Pipettieren eingerechnet) dieser Stammlösung werden in 1:10 mit Adsorptionspuffer II auf eine AK-Konzentration von 0,1 mg/mL verdünnt.
- Ein 51 µL Aliquot der verdünnten AK-Lösung wird abgenommen und in einem nicht BSA-vorbehandelten 200 µL-Mikroreaktionsgefäß mit 100 µL Adsorptionspuffer II verdünnt.
- Das gesamte Volumen dieser Lösung wird unter gleichmäßigem Rühren mit der Pipettenspitze zu der vorbereiteten Gold-Kolloid-Lösung gegeben.
- Die Konjugationslösung wird auf dem Vortexer ca. 20 Sekunden gründlich vermischt und danach für 40 min bei RT inkubiert.
- Es wird eine 10 %igen (w/w) BSA-Lösung in Adsorptionspuffer II vorbereitet.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 100 µL der BSA-Lösung unter Rühren mit der Pipettenspitze zu der Konjugationslösung gegeben.
- Die Konjugationslösung wird auf dem Vortexer ca. 20 Sekunden gründlich vermischt und danach für weitere 20 min bei RT inkubiert.
- Die Konjugationslösung wird 30 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen.
- Das zurückbleibende Pellet wird mit 100 µL Lagerungspuffer III aufgenommen und (wenn notwendig) einige Sekunden im Ultraschallbad resuspendiert. Die resuspendierte Lösung wird für 15 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert.
- Der Waschvorgang wird insgesamt maximal 5x durchgeführt. Ggf. wird die Zentrifugationsgeschwindigkeit nach ca. 3-4 Waschschritten auf 4000-5000 rpm reduziert, wenn das Pellet nach der Zentrifugation nicht wieder problemlos resuspendiert werden kann.
- Das gewaschene Pellet wird endgültig in 50 µL Lagerungspuffer III resuspen-

1.2 Testsystem für Staphylococcus Enterotoxin B in wässrigen Proben

diert und ca. 20 s im Ultraschallbad behandeln.

- Vor dem Auftrag auf das Conjugate Pad wird das Antikörper-Gold-Konjugat kurz (5-30 s) im Ultraschallbad behandelt, um etwaige Sedimente und Cluster aufzulösen.

1.2.2 Herstellung der Teststreifen

- Die Herstellung der Teststreifen erfolgt wie in Kap. 1.1 beschrieben.

1.3 Testsystem für Microcystin-LR in wässrigen Proben

1.3.1 Herstellung des Konjugates

Die Angaben gelten für einen Reaktionsansatz von 1,15 mL und ca. 50 µL unverdünntes Konjugat:

- Ein ausreichendes Volumen der kolloiden Gold-Lösung wird mit wenigen Tropfen Kaliumcarbonat-Lösung (S. 177) auf den gewünschten pH-Wert von pH 9,2 eingestellt.
- 1 mL der eingestellten kolloiden Lösung wird in einem BSA-beschichteten Mikroreaktionsgefäß vorgelegt.
- Es wird eine Antikörper-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL anti-MC-LR_{Maus}, Klon MC10E7, nach Herstellerangaben angesetzt.
- 21 µL (Verlust durch Pipettieren eingerechnet) dieser Stammlösung werden in 1:10 mit Adsorptionspuffer II auf eine AK-Konzentration von 0,1 mg/mL verdünnt.
- Ein 51 µL Aliquot der verdünnten AK-Lösung wird abgenommen und in einem nicht BSA-vorbehandelten 200 µL-Mikroreaktionsgefäß mit 100 µL Adsorptionspuffer III verdünnt.
- Das gesamte Volumen dieser Lösung wird unter gleichmäßigem Rühren mit der Pipettenspitze zu der vorbereiteten Gold-Kolloid-Lösung gegeben.
- Die Konjugationslösung wird auf dem Vortexer ca. 20 Sekunden gründlich vermischt und danach für 40 min bei RT inkubiert.
- Es wird eine 10 % (w/w) BSA-Lösung in Adsorptionspuffer III vorbereitet.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 100 µL der BSA-Lösung unter Rühren mit der Pipettenspitze zu der Konjugationslösung gegeben.
- Die Konjugationslösung wird auf dem Vortexer ca. 20 Sekunden gründlich vermischt und danach für weitere 20 min bei RT inkubiert.
- Die Konjugationslösung wird 30 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Mikropipette abgenommen.
- Das zurückbleibende Pellet wird mit 100 µL Lagerungspuffer III aufgenommen und (wenn notwendig) einige Sekunden im Ultraschallbad resuspen-

diert. Die resuspendierte Lösung wird für 15 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

- Der Waschvorgang wird insgesamt maximal 5x durchgeführt. Ggf. wird die Zentrifugationsgeschwindigkeit nach ca. 3-4 Waschschritten auf 4000-5000 rpm reduziert, wenn das Pellet nach der Zentrifugation nicht wieder problemlos resuspendiert werden kann.
- Das gewaschene Pellet wird endgültig in 50 µL Lagerungspuffer III resuspendiert und ca. 20 s im Ultraschallbad behandeln.
- Vor dem Auftrag auf das Conjugate Pad wird das Antikörper-Gold-Konjugat kurz (5-30 s) im Ultraschallbad behandelt, um etwaige Sedimente und Cluster aufzulösen.

1.3.2 Herstellung der Teststreifen

- Die Herstellung der Teststreifen erfolgt wie in Kap. 1.1 beschrieben.

1.4 Testsystem für Microcystin-LR in Muschelfleisch

- Die Herstellung der Teststreifen erfolgt wie in Kap. 1.3 beschrieben.

1.5 BCA-Test zur Bestimmung des MC-LR:BSA-Gehalts

- Die Durchführung des BCA-Tests erfolgte nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Standardprotokoll für Tests im Mikrotiterplatten-Format [Uptima, 2006]:
- Alle Reagenzien und Proben werden auf RT gebracht.
- Es werden 5 BSA-Standards im zur Herstellung von MC-LR:BSA verwendeten PBS-Puffer angesetzt (Konzentrationsbereich: 0,1-10 mg/mL)
- 25 µL jeder Probe und jedes Standards werden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert (möglichst mehrere Kavitäten pro Lösung).
- Es wird ausreichend BCA-Mix aus den gebrauchsfertigen BCA-Lösungen A und B (Verhältnis 50:1) frisch angesetzt.
- In jede befüllte Kavität werden 200 µL des BCA-Mix' gegeben und gut mit der Probe vermischt.
- Die Mikrotiterplatte wird mit Plastikfolie abgedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.
- Nach der Inkubation wird die Mikrotiterplatte kurz bei RT abgekühlt. Danach wird die OD der Proben in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gegen eine Nullprobe (PBS-Puffer mit BCA-Mix) vermessen.
- Anhand der gleichzeitig aufgenommenen BSA-Standardkurve kann die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden.

2. Auswertungsroutinen für Optimas 6.5

2.1 Bildvorbereitung

```
/* OpenImage ( NULL, 0.0 : 3.9485 :: 5.2654 : 0.0, TRUE, 1); */
BandOfInterest = 0;
BandToView = 0;

SetColorMode (0 : 1 : 8 : 1 : 1 : 3);

/* RunMacro ("D:/PROGRAMME/OPTIMAS 6.5/macsrc/rotate/rotate.mac");
WHL_RotateROI ( 180.000, 0 );
CloseWindow ( "Rotate Image" ); */

ZoomFactor = -2;
PositionWindow ("Image2", -2);

ActiveView.ScrollPosYView = 1000;

Calibrate();
```

2.2 Markierung der Testlinien

```
OpenImage ( NULL, 0.0 : 3.9485 :: 5.2654 : 0.0, TRUE, 1);

if ( Prompt("Gleich zur Kalibrierung?") )
    RunMacro ("D:/Optimas65/macros/nils_bildvorbereitung.mac");
else

ZoomFactor = -2;
BandOfInterest = 2;
BandToView = 2;
Retouching ();
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
/* Makro zur Auswertung von Teststreifen */

/*Definition der verwendeten Variablen */
Delete();
REAL PixelGroesse = 0; /* Enthält die Kantenlänge eines Pixels. */
REAL PixelFlaeche = 0; /* Enthält die Fläche eines Pixels. */
XUnterKante; /* Enthält den X-Wert der Streifen-Unterkante. */
YUnterKante; /* Enthält den Y-Wert der Streifen-Unterkante. */
XOberKante; /* Enthält den X-Wert der Streifen-Oberkante. */
YOberKante; /* Enthält den Y-Wert der Streifen-Oberkante. */
XMittel; /* Enthält den mittleren X-Wert des Streifens. */
YMittel; /* Enthält den mittleren Y-Wert des Streifens. */
XOberKanteGes; /* Enthält den X-Wert der ROI-Oberkante. */
XUnterKanteGes; /* Enthält den X-Wert der ROI-Unterkante. */
YOberKanteGes; /* Enthält den Y-Wert der ROI-Oberkante. */
YUnterKanteGes; /* Enthält den Y-Wert der ROI-Unterkante. */
XOberKanteRef; /* Enthält den X-Wert der Referenzbereich-Oberkante. */
XUnterKanteRef; /* Enthält den X-Wert der Referenzbereich-Unterkante. */
YOberKanteRef; /* Enthält den Y-Wert der Referenzbereich-Oberkante. */
YUnterKanteRef; /* Enthält den Y-Wert der Referenzbereich-Unterkante. */
XOberKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Oberkante. */
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
XUnterKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Unterkante. */
YOberKanteMess; /* Enthält den Y-Wert der Messbereich-Oberkante. */
YUnterKanteMess; /* Enthält den X-Wert der Messbereich-Unterkante. */
REAL MeanGrayRef = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert des Referenz-
bereichs. */
REAL MeanGraySDRef = 0; /* Enthält die Standardabweichung des middle-
ren Grauwertes des Referenzbereichs. */
REAL PixelZahlRef = 0; /* Enthält die Pixelanzahl des Referenzbe-
reichs. */
REAL GrayGesMess = 0; /* Enthält den Gesamt-Grauwert des Messbereichs.
*/
REAL GrayWert = 0; /* Enthält den Gesamtgrauwert eines bestimmten
Grauwerts im Messbereich. */
REAL PixelZahlHist = 0; /* Enthält die Pixelanzahl eines bestimmten
Grauwerts im Messbereich. */
REAL PixelZahlHistGes = 0; /* Enthält die Gesamtpixelanzahl der ausge-
werteten Pixel im Messbereich. */
REAL OberGrenze = 0; /* Enthält die Obergrenze für die FOR-Schleife.
*/
LONG iT = 0; /* Enthält die Zähl-Variable für die FOR-Schleife. */
REAL MeanGrayMess = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert des Messbe-
reichs. */
REAL MeanGraySDMess = 0; /* Enthält die Standardabweichung des middle-
ren Grauwertes des Messbereichs. */
REAL PixelZahlMess = 0; /* Enthält die Gesamtpixelanzahl des Messbe-
reichs. */
REAL PixelZahlDiff = 0; /* Enthält die Differenz aus Gesamtpixelanzahl
und ausgewerteter Gesamtpixelanzahl im Messbereich. */
REAL GrayGesMess = 0; /* Enthält den Gesamtgrauwert im Messbereich. */
REAL MessFlaeche = 0; /* Enthält die Größe der Messfläche in mm^2. */
REAL GrayGesRef = 0; /* Enthält den maximalen Gesamtgrauwert im Mess-
bereich. */
REAL GrayDiff = 0; /* Enthält die Differenz aus maximalem Gesamtgrau-
wert und Gesamtgrauwert im Messbereich. */
REAL GrayMittPix = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert pro Pixel. */
REAL GrayMittFlaeche = 0; /* Enthält den mittleren Grauwert pro Fläche
in mm^2. */
CHAR MeanGrayRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR MeanGraySDRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in
eine CHAR-Variable. */
CHAR PixelZahlRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR MeanGrayMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR MeanGraySDMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in
eine CHAR-Variable. */
CHAR PixelZahlMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in
eine CHAR-Variable. */
CHAR MessFlaecheText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR GrayGesRefText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR GrayGesMessText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR GrayDiffText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR GrayMittPixText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in eine
CHAR-Variable. */
CHAR GrayMittFlaecheText; /* Umwandlung des entsprechenden Wertes in
eine CHAR-Variable. */
CHAR DateiName;
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden
gelöscht. */
Calibrate("Henning");

/* Der Counter wird abgefragt */
INTEGER counter;
fh = OpenFile ("C:/Henning/counter.dat", 0x0002);
ReadFile(fh, 10, counter);
CloseFile(fh);

/* Vorgaben werden eingegeben und berechnet. */
if (counter == 0)
{
    Dateiname = Prompt("Bitte geben Sie den Dateinamen ein","CHAR");
    fh = OpenFile ("C:/Henning/name.dat", 0x1000);
    Dateiname = "C:/Henning/" : Dateiname : ".txt";
    WriteFile (fh, Dateiname);
    CloseFile(fh);
    fh = OpenFile(Dateiname, 0x1000);
    CloseFile(fh);
    PixelGroesse = Prompt("Bitte geben Sie die Pixelgröße in cm
ein","REAL"); /* Kantenlänge eines Pixels auf Basis der Kalibration
wird vom User eingegeben */
    PixelGroesse = PixelGroesse * 10; /* Umrechnung der Kantenlänge in mm
*/
}
if (counter != 0)
{
    fh = OpenFile ("C:/Henning/pixel.dat", 0x0002);
    ReadFile(fh, 100, PixelGroesse);
    CloseFile(fh);
    fh = OpenFile ("C:/Henning/name.dat", 0x0002);
    ReadFile(fh, 100, Dateiname);
    CloseFile(fh);
}
Show(PixelGroesse);
fh = OpenFile ("C:/Henning/pixel.dat", 0x0002);
WriteFile (fh, PixelGroesse);
CloseFile(fh);

PixelFlaeche = PixelGroesse * PixelGroesse; /* Berechnung der Pixel-
fläche in mm^2. */

/* Counter wird aktualisiert */
counter = counter +1;
fh = OpenFile ("C:/Henning/counter.dat", 0x1000);
WriteFile (fh, counter);
CloseFile(fh);

ActiveView.ScrollPosYView = counter * 90;

/* Es werden die Referenzpunkte markiert, die zur Bestimmung der ROI
dienen. */
/* MacroMessage("Bitte markieren Sie die untere rechte Ecke des Test-
streifens."); */
SetExport(PtPoints,1,TRUE); /* Export-Bedingungen für 1. Datenpunkt
auf "To DDE" */
CreatePoints(); /* User markiert 1. Datenpunkt */
Extract(); /* Daten des markierten Punktes werden ermittelt */

/* X- und Y-Wert des Datenpunktes wird an Variable übergeben */
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
XUnterKante = PtPoints[0];
YUnterKante = PtPoints[1];

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden
gelöscht. */

/* MacroMessage("Bitte markieren Sie die rechte obere Ecke des Test-
streifens."); */
SetExport(PtPoints,1,TRUE); /* Export-Bedingungen für 2. Datenpunkt
auf "To DDE" */
CreatePoints(); /* User markiert 2. Datenpunkt */
Extract(); /* Daten des markierten Punktes werden ermittelt */

/* X- und Y-Wert des Datenpunktes wird an Variable übergeben */
XOberKante = PtPoints[0];
YOberKante = PtPoints[1];

/* Es wird die Mitte der Unterkante bestimmt */
XMittel = ((XOberKante + XUnterKante)/2);
YMittel = ((YOberKante + YUnterKante)/2);

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden
gelöscht. */

/*Die Region Of Interest wird festgelegt */
XOberKanteGes = XMittel -1.500;
XUnterKanteGes = XMittel;
YOberKanteGes = YMittel +0.180;
YUnterKanteGes = YMittel -0.180;
SelectROI (XOberKanteGes : YOberKanteGes :: XUnterKanteGes : YUnter-
KanteGes);

/* Der Referenzbereich für das Hintergrundsignal wird festgelegt in
cm. */
XOberKanteRef = XMittel -0.650;
XUnterKanteRef = XMittel -0.350;
YOberKanteRef = YOberKanteGes;
YUnterKanteRef = YUnterKanteGes;

/* Wertaufnahme aus dem Referenzbereich */
AreaCNVFactors[9:10] = 0:255; /* Die Vorbedingungen für die Wertauf-
nahme werden festgelegt. */
SetExport(ArHistogramStats,1,TRUE); /* Export der Histogramm-Statistiken
wird auf "DDE" gesetzt. */
SetExport(ArPixelCounts,1,TRUE); /* Export des Pixel-Zählers wird auf
"DDE" gesetzt. */
CreateArea(XOberKanteRef : YOberKanteRef :: XUnterKanteRef : YOberKanteRef
:: XUnterKanteRef : YUnterKanteRef :: XOberKanteRef : YUnterKanteRef
:: XOberKanteRef : YOberKanteRef,NULL,NULL,3); /* Referenz-
bereich wird festgelegt. */

/* if (Prompt("Wollen Sie die Referenzfläche noch verschieben?",2)) */
/* { */
/*     MoveObject(); */
/* } */

MoveObject();

/* Daten werden aus dem Referenzbereich extrahiert und Variablen zuge-
wiesen. */
Extract();
MeanGrayRef = ArHistogramStats[0];
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
MeanGraySDDef = ArHistogramStats[1];
PixelZahlRef = ArPixelCounts[0];

ClearScreen(); /* Sämtliche Messpunkte/aktive Bereiche im Bild werden
gelöscht. */

/* Der Messbereich um die Capture Line wird festgelegt in cm. */
XOberKanteMess = XMittel-0.980;
XUnterKanteMess = XMittel-0.920;
YOberKanteMess = YOberKanteGes;
YUnterKanteMess = YUnterKanteGes;

/* Wertaufnahme aus dem Referenzbereich */
SetExport(ArHistogramStats,1,TRUE); /* set "To DDE" */
SetExport(ArHistogram,1,TRUE); /* set "To DDE" */
SetExport(ArPixelCounts,1,TRUE); /* set "To DDE" */
CreateArea(XOberKanteMess : YOberKanteMess :: XUnterKanteMess : YOber-
KanteMess :: XUnterKanteMess : YUnterKanteMess :: XOberKanteMess :
YUnterKanteMess :: XOberKanteMess : YOberKanteMess, NULL, NULL, NULL, 3);

/* if (Prompt("Wollen Sie die Messfläche noch verschieben?",2)) */
/* {MoveObject();} */

MoveObject();

/* Daten werden aus dem Messbereich extrahiert und Variablen zugewie-
sen. */
Extract();
OberGrenze = MeanGrayRef +1;
for( iT = 0; iT < OberGrenze; ++iT)
{
    PixelZahlHist = ArHistogram[iT];
    GrayWert = ArHistogram[iT] * iT;
    PixelZahlHistGes = PixelZahlHistGes + PixelZahlHist;
    GrayGesMess = GrayGesMess + GrayWert;
    GrayWert = 0;
    PixelZahlHist = 0;
}
MeanGrayMess = ArHistogramStats[0];
MeanGraySDMess = ArHistogramStats[1];
PixelZahlMess = ArPixelCounts[0];

/* Diverse Messwerte werden berechnet. */
PixelZahlDiff = PixelZahlMess - PixelZahlHistGes;
GrayGesMess = GrayGesMess + (PixelZahlDiff * MeanGrayRef);
MessFlaeche = PixelZahlMess * PixelFlaeche;
GrayGesRef = PixelZahlMess * MeanGrayRef;
GrayDiff = GrayGesRef - GrayGesMess;
GrayMittPix = GrayDiff / PixelZahlMess;
GrayMittFlaeche = GrayDiff / MessFlaeche;

/* Die Messwerte werden den Textvariablen zugewiesen. */
MeanGrayRefText = "Mittlerer Hintergrund:\t" : ToText(MeanGrayRef) :
"\n";
MeanGraySDDefText = "SD:\t" : ToText(MeanGraySDDef) : "\n";
PixelGroesseText = "PixelGroesse in mm:\t" : ToText(PixelGroesse) :
"\n";
PixelZahlRefText = "Pixelzahl, Referenflaeche:\t" : ToText(PixelZahl-
Ref) : "\n";
MeanGrayMessText = "Mittlere Intensitaet, Messbereich:\t" :
```

2.3 Auswertung der Teststreifen

```
ToText (MeanGrayMess) : "\n";
MeanGraySDMessText = "SD:\t" : ToText (MeanGraySDMess) : "\n";
PixelZahlMessText = "Pixelzahl, Messbereich:\t" : ToText (PixelZahl-
Mess) : "\n";
MessFlaecheText = "Flaeche, Messbereich:\t" : ToText (MessFlaeche) :
"\n";
GrayGesRefText = "Maximaler Gesamtgrauwert, Messbereich:\t" :
ToText (GrayGesRef) : "\n";
GrayGesMessText = "Ausgewerteter Gesamtgrauwert, Messbereich:\t" : To-
Text (GrayGesMess) : "\n";
GrayDiffText = "Differenz:\t" : ToText (GrayDiff) : "\n";
GrayMittPixText = "Intensitaet pro Pixel:\t" : ToText (GrayMittPix) :
"\n";
GrayMittFlaecheText = "Intensitaet pro /mm^2:\t" : ToText (GrayMitt-
Flaeche) : "\n";

/* Ein Daten-File wird erzeugt und die Messwerte hineingeschrieben. */
fh = OpenFile (DateiName, 0x0002);
PositionFile (fh, 0L, 2);
WriteFile (fh, MeanGrayRefText : MeanGraySDRefText : PixelGroesseText
: PixelZahlRefText : MeanGrayMessText : MeanGraySDMessText : Pixel-
ZahlMessText : GrayGesRefText : GrayGesMessText : GrayDiffText : Mess-
FlaecheText : GrayMittPixText : GrayMittFlaecheText);
CloseFile (fh);

/* Endabfrage */
if (Prompt("Wollen Sie noch einen Streifen auswerten?",2))
{
    RunMacro("macros/henning_auswertung.mac");
}
else
{
    fh = OpenFile ("C:/Henning/counter.dat", 0x1000);
    INTEGER counter = 0;
    WriteFile (fh, counter);
    CloseFile(fh);
    fh = OpenFile ("C:/Henning/name.dat", 0x0200);
    /* MacroMessage("Fertig.");*/
}
```

3. Verwendete Lösungen

Adsorptionspuffer I zur Adsorption von Antikörpern auf Goldpartikeln

- 2 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) werden in
- dest. Wasser gelöst.

Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgt im sauren pH-Bereich mit 0,1 mol Salzsäure (HCl) bzw. im alkalischen pH-Bereich mit 0,1 mol Kaliumcarbonat-Lösung.

Adsorptionspuffer II zur Adsorption von Antikörpern auf Gold-Partikeln

- 5 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) und
- 150 mmol Natriumchlorid (NaCl) werden in
- dest. Wasser gelöst.

Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgt im sauren pH-Bereich mit 0,1 mol Salzsäure (HCl) bzw. im alkalischen pH-Bereich (i.A. pH 9,2) mit 0,1 mol Kaliumcarbonat-Lösung.

Adsorptionspuffer III zur Adsorption von Antikörpern auf Latex-Partikeln

Es wird ein PBS-Puffer im physiologischen Bereich (pH 7,4; 150 mM NaCl) verwendet.

Applikationspuffer I für Proteinlinien

- 5 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) und
- 150 mmol NaCl
- 10 g Succrose werden mit
- 800 mL (800 g) dest. Wasser aufgefüllt.
- Die Einstellung des pH-Wertes von pH 8 erfolgt mit HCl.
- Danach wird die Pufferlösung mit dest. Wasser auf 1000 g aufgefüllt.

Applikationspuffer II für MC-LR:BSA

- 5 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) und
- 150 mmol NaCl
- 10 g Succrose werden mit
- 800 mL (800 g) dest. Wasser aufgefüllt.
- Die Einstellung des pH-Wertes von pH 8 erfolgt mit HCl.
- Danach wird die Pufferlösung mit dest. Wasser auf 1000 g aufgefüllt.

Boratpuffer zur Herstellung von MC-LR:BSA

- 100 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) werden in
- dest. Wasser gelöst.
- Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgt mit 0,1 mol Natronlauge.

Kaliumcarbonat-Lösung zur pH-Einstellung

- 100 mmol Kaliumcarbonat (K_2CO_3) werden in Wasser gelöst.

Färbelösung für Proteine

- Konz. Essigsäure (CH_3COOH) wird mit
- dest. Wasser auf 5% (w/v) verdünnt.
- 0,5% (w/v) Ponceau S werden in der verdünnten Essigsäure gelöst.

Imprägnierungspuffer I für Conjugate Pads

- 12,1 g TRIS (100 mmol)
- 5 g BSA, Fraction V, pH 7, Serva 11930
- 2,5 g Tween 20®

werden in 800 mL dest. Wasser unter Rühren gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt und die Lösung wird auf 1000 mL aufgefüllt. Das hergestellte Volumen reicht zur gleichzeitigen Imprägnierung von 20 Vliesstreifen.

Imprägnierungspuffer II für Conjugate Pads

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Je nach gewünschtem pH-Wert (z.B.: pH 8) werden die Lösungen zusammengegeben. Eine weitere Verschiebung des pH-Wertes kann mit sehr geringen Mengen *tri*-Kaliumphosphat, K_3PO_4 , oder *ortho*-Phosphorsäure, H_3PO_4 , erfolgen. Je nach Volumen werden

- 0,5% (w/w) BSA, Fraction V, pH 7, Serva 11930 und
- 0,25% (w/w) Tween 20®

zugegeben. 500 mL dieser Lösung reichen zur gleichzeitigen Imprägnierung von 10 Vliesstreifen.

KPP-Puffer I zur Herstellung von Verdünnungsreihen

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Der gewünschte pH-Wert (pH 7) wird durch Zusammengeben der Lösungen eingestellt.

KPP-Puffer II zum Waschen von Membranstanzlingen

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Der gewünschte pH-Wert (pH 6,9) wird durch Zusammengeben der Lösungen und evtl. eine Zugabe geringer Mengen *ortho*-Phosphorsäure, H_3PO_4 , eingestellt.

KPP-Puffer III zur Lösung von *Staphylococcus* Enterotoxin B

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Der gewünschte pH-Wert (pH 6,9) wird durch Zusammengeben der Lösungen und evtl. eine Zugabe geringer Mengen *ortho*-Phosphorsäure, H_3PO_4 , eingestellt.

KPP-Puffer IV zur Lösung von *Staphylococcus* Enterotoxin B

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Der gewünschte pH-Wert (pH 6,9 - pH 11,1) wird durch Zusammengeben der Lösungen und evtl. eine Zugabe geringer Mengen *ortho*-Phosphorsäure, H_3PO_4 , eingestellt.

KPP-Puffer V zur Lösung von MC-LR

- 11,44 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.
- 6,805 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , (50 mmol) werden unter Rühren in
- 500 mL dest. Wasser gelöst.

Der gewünschte pH-Wert (pH 6,9) wird durch Zusammengeben der Lösungen und evtl. eine Zugabe geringer Mengen *ortho*-Phosphorsäure, H_3PO_4 , eingestellt.

Lagerungspuffer I

- 20 mmol TBS,
- 150 mmol NaCl,
- 1% (w/v) BSA und
- 0,05% (w/v) NaN_3

werden in dest. Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf pH 8,2 eingestellt.

Lagerungspuffer II

- 1% (w/w) BSA,
- 0,05% (w/w) NaN_3

werden in physiologischem PBS-Puffer (pH 7,4, 150 mM NaCl) gelöst.

Lagerungspuffer III

- 5 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) und
- 150 mmol Natriumchlorid (NaCl) werden in
- dest. Wasser gelöst.
- Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgt im sauren pH-Bereich mit 0,1 mol Salzsäure (HCl) bzw. im alkalischen pH-Bereich (i.A. pH 9,2) mit 0,1 mol Kaliumcarbonat-Lösung.

PBS-Puffer zur Herstellung von MC-LR:BSA

- 1,361 g Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (10 mmol) und
- 16,016 g *di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ (70 mmol) und
- 8,5 g NaCl (145 mmol) werden in
- 1000 mL dest. Wasser gelöst.
- Der pH-Wert wird auf pH 7,6 eingestellt.

Stammpuffer für hCG-Proben

- 5 mmol Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) und
- 150 mmol Natriumchlorid (NaCl) werden in
- dest. Wasser gelöst.

Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes pH 9,2 erfolgt mit 0,1 mol Natronlauge (NaOH).

Triethanolaminpuffer zur Herstellung von MC-LR:BSA

- 7,46 g Triethanolamin (50 mmol) werden in
- 1000 mL dest. Wasser gelöst.
- Der pH-Wert wird auf pH 8 eingestellt.
- 8,77 g NaCl (150 mmol) und
- 0,2922 g EDTA (1 mmol) werden zugesetzt.

4. Verwendete Chemikalien

4.1 Antikörper

anti-Maus-IgG_{Kaninchen} Control Line: sekundärer Mab in Lösung (1 mg/mL) zum Nachweis von Maus-IgG. Alchemy Laboratories Ltd., Dundee, UK.

anti-MC-LR_{Maus}, Klon MC10E7: muriner MAb zur Antikörper-Gold-Konjugation an Gold-Partikel. Axxora Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland.

anti-Schaf-IgG_{Esel} S2763: sekundärer MAb aus Eseln zum Nachweis von Schaf-IgG. Sigma-Aldrich S2763. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

anti-SEB_{Maus}, Klon S222: muriner MAb zur Immobilisierung an CN-Membranen. HyTest Ltd., Turku, Finnland.

anti-SEB_{Maus}, Klon S643: muriner MAb zur Antikörper-Gold-Konjugation an Gold-Partikel. HyTest Ltd., Turku, Finnland.

anti-SEB_{Schaf} SLBI 202: PAb aus Schafen zur Antikörper-Gold-Konjugation an Gold-Partikel und zur Immobilisierung an CN-Membranen. Toxin Technology, Inc., Florida, USA.

anti-SEB_{Kaninchen} LBI 202: PAb aus Kaninchen zur Immobilisierung an CN-Membranen. Toxin Technology, Inc., Florida, USA.

4.2 Membranen und Vliese

90 CNPH: CN-Membran für LFD-Anwendungen, Porengröße k.A. MDI Advanced Microdevices Ltd., Ambala Cantt, Indien.

17 Chr: Baumwollvlies zur Herstellung von Absorbent Pads. Whatman International Ltd., Maidstone, UK.

CN-Membran 1302: CN-Membran für Filtrationsanwendungen, Porengröße 3 µm. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

CN-Membran 1303: CN-Membran für Filtrationsanwendungen, Porengröße 1,2 µm. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

CNPC-SS12: CN-Membran für LFD-Anwendungen, Porengröße 12 µm. MDI Advanced Microdevices Ltd., Ambala Cantt, Indien.

GL-187: Klebstoff beschichtete Plastikfolie zur Herstellung von LFD-Teststreifen. G & L Precision Die Cutting, Inc., San Jose, USA.

Reemay 2040: Polyestervlies zur Herstellung von Conjugate Pads. BBA Fiber-

web, Nashville, USA.

Unisart CN 140: CN-Membran für LFD-Anwendungen, Porengröße k.A. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

Unisart CN 200: CN-Membran für LFD-Anwendungen Porengröße k.A. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

4.3 Toxine

***Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB):** Sigma-Aldrich S4881. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

Microcystin-LR (MC-LR): ALX-350-012. Axxora Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland.

4.4 Chemikalien

anti-SEB-Antikörper-Gold-Konjugat aus anti-SEB_{Schaf} SLBI 202: Batch 12986, OD 9,04 @ 530 nm. Alchemy Laboratories Ltd., Dundee, UK.

anti-SEB-Antikörper-Gold-Konjugat_{Maus} aus anti-SEB_{Maus} S643: Batch 14982, OD 10,0 @ 530 nm. Alchemy Laboratories Ltd., Dundee, UK.

BCA-Testreagenzien: Uptima „BC Assay: Protein Quantitation Kit“ FT-40840, Uptima, Montluçon, Frankreich.

Bovines Serumalbumin (BSA): BSA, Fraction V, pH 7, Serva 11930, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland.

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): ED. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

Goldlösung EM.GC 40: kolloide Goldlösung zur Herstellung von Antikörper-Gold-Antikörper-Gold-Konjugaten, mittlere Partikelgröße 40 nm. BBI International, Cardiff, UK.

Humanes Choriongonadotropin (hcG): Sigma-Aldrich CG-10, Lot 31K1258, Aktivität: 6250 IU/mg. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 : Aldrich 229806. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

***di*-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$:** Sigma P5504. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

***tri*-Kaliumphosphat, K_3PO_4 :** Sigma-Aldrich P5629. Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

Kohlenstoffbeschichtete Grids zur TEM-Aufnahme: Carbon Support Films, Cu 300 mesh, Quantifoil Micro Tools GmbH.

ortho-Phosphorsäure, H_3PO_4 : Riedel-de Haën 04102 . Riedel-de Haën GmbH, Seelze, Deutschland.

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS): Sigma-Aldrich 252859. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.

5. Verwendete Geräte

Applikationsgerät für Protein-Lösungen: BioJet XYZ 3000 mit BioJet Quanti 3000 Dispenser, BioDot Ltd., Hantington, Großbritannien.

Kamera: Minolta Dimage 7i, Minolta Co., Ltd., Minolta Europe GmbH, Langenhagen, Deutschland.

Kamera-Mikroskop: Olympus BX 41, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland.

Kamera-Mikroskop: Olympus IX 50, Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland.

Lumibox I & II: Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Hannover, Deutschland.

pH-Elektrode: InLab 422, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland.

pH-Meter: pH-Meter 605, Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt.

Photometer für Mikrotiterplatten: Thermo Labsystems Multiskan Spectro, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland.

Photometer zur Protein-Bestimmung: Gene Quant Pro, Biochrom Ltd. Cambridge, Großbritannien.

Transmissionselektronenmikroskop: JEM-2100F-UHR, JEOL (Germany) GmbH, Eching, Deutschland.

Turbidimeter: Turbiquant 1100 IR, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland.

Ultraschallbad: Sonorex Super RK 510H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland.

Ultra Turrax: Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland. Germany; (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik)

Zentrifuge: Heraeus Biofuge Pico, Thermo Electron Corporation, Langensel-

bold, Deutschland.

Zentrifuge mit Kühlung: B.Braun Sigma 3K20, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland.

6. Verwendete Software

Photometer-Software: Multiskan Spektrum, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland.

OpenCalc 2.0: OpenOffice.org & Sun Microsystems, Inc., Santa Clara, USA.

Optimas 6.5: Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, USA.

Origin 7.5: OriginLab Corporation, Northampton, USA.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	nach Miyai, 1991, Klewitz, 2004 und Stückmann, 2002
Abbildung 2	auf Grundlage von VDPH-Homepage, 2006
Abbildung 3	auf Grundlage von nach EDMA, 2006
Abbildung 4	Merck KGaA
Abbildung 5	Stückmann, 2005
Abbildung 6	Stückmann, 2005
Abbildung 7	Stückmann, 2006
Abbildung 8	Blue Grass Drug Screen, Inc.
Abbildung 9	Stückmann, 2005
Abbildung 10	nach Papageorgiou, 1998 und Moss
Abbildung 11	Wawra, 2005
Abbildung 12	Stückmann, 2005
Abbildung 13	Kroll/Stückmann, 2004
Abbildung 14	nach Kroll, 2004
Abbildung 15	Kroll, 2004
Abbildung 16	Kroll, 2004
Abbildung 17	nach Kroll, 2004
Abbildung 18	nach Kroll, 2004
Abbildung 19	nach Kroll, 2004
Abbildung 20	nach Kroll, 2004
Abbildung 21	nach Tippkötter, 2005
Abbildung 22	nach Tippkötter, 2005
Abbildung 23	nach Tippkötter, 2005
Abbildung 24	nach Tippkötter, 2005
Abbildung 25	nach Kroll, 2004
Abbildung 26	Stückmann, 2005
Abbildung 27	Stückmann, 2004
Abbildung 28	Minolta Co., Ltd.
Abbildung 29	Stückmann, 2005
Abbildung 30	Stückmann, 2005
Abbildung 31	Stückmann, 2006
Abbildung 32	Stückmann, 2005
Abbildung 33	Stückmann, 2004
Abbildung 34	Stückmann, 2004
Abbildung 35	Stückmann, 2004
Abbildung 36	Stückmann, 2004
Abbildung 37	Stückmann, 2005
Abbildung 38	Stückmann, 2005
Abbildung 39	Stückmann, 2005
Abbildung 40	Stückmann, 2005
Abbildung 41	Stückmann, 2005
Abbildung 42	Stückmann, 2005
Abbildung 43	Stückmann, 2005

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 44	Stückmann, 2005
Abbildung 45	Stückmann, 2005
Abbildung 46	Stückmann, 2005
Abbildung 47	Stückmann, 2005
Abbildung 48	Stückmann, 2005
Abbildung 49	Stückmann, 2005
Abbildung 50	Stückmann, 2005
Abbildung 51	Stückmann, 2005
Abbildung 52	Stückmann, 2005
Abbildung 53	nach Zeck, 2001, Stückmann, 2005
Abbildung 54	Stückmann, 2004
Abbildung 55	Stückmann, 2004
Abbildung 56	Stückmann, 2005
Abbildung 57	Stückmann, 2005
Abbildung 58	Stückmann, 2005
Abbildung 59	Stückmann, 2005
Abbildung 60	Stückmann, 2005
Abbildung 61	Stückmann, 2005
Abbildung 62	Stückmann, 2005
Abbildung 63	Stückmann, 2005
Abbildung 64	Stückmann, 2005
Abbildung 65	Stückmann, 2005
Abbildung 66	Stückmann, 2005
Abbildung 67	Stückmann, 2005
Abbildung 68	Wawra, 2005
Abbildung 69	Wawra, 2005
Abbildung 70	nach Wawra, 2005
Abbildung 71	Wawra, 2005
Abbildung 72	nach Wawra, 2005

8. Abkürzungen

BCA	Bicinchoninsäure (engl: bicinchoninic acid), 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure.
BSA	bovines Serumalbumin
DoE	Design of Experiments
EDMA	European Diagnostic Manufacturers Association
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl: Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FG	Frisch- oder Feuchtgewicht
Ggf.	Gegebenenfalls
GLISA	Gold-Labeled Immunosorbent Assay
hcG	human chorionic Gonadotropin (menschliches Choriongonadotropin)
i.A.	im Allgemeinen
IgG	Immunglobulin G
IU	International Unit, internationale Einheit für Enzym-/Hormonaktivität
IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostik
k.A.	keine Angaben
Kap.	Kapitel
KB-Format	Kleinbild-Format
LFD	lateral-flow device (dtsch: Querfließtest)
MAb	monoclonal antibody (dtsch: monoklonale Antikörper)
MC-LR	Microcystin-LR
MHC	major histocompatibility complex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex)
Mio.	Millionen
mIU	Tausendstel einer International Unit
Mrd.	Milliarden
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NTU	Nephelometric Turbidity Unit (Nephelometrischer Trübungswert)
OD	optische Dichte
OTC	Over the counter-Tests (dtsch: „über die Theke“, Selbsttests für Patienten)
PAb	polyclonal antibody (dtsch: polyklonale Antikörper)
pl	isoelektrischer Punkt
ppb	parts per billion (Milliardstel)
ppt	parts per trillion (Trillionstel)
PS	Polystyrol
rpm	rounds per minute (dtsch: Umdrehungen pro Minute)
s.a.	siehe auch
SAG	Superantigen(e)
SE	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin B
T20	Tween 20®
TG	Trockengewicht
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen, Volumenprozent, Vol.-%
VDGH	Verband der Diagnostica-Industrie
vgl.	Vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen,
w/w	Gewicht pro Gewicht, Gewichtsprozent, Gew.-%
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Lebenslauf

Name: Henning Stückmann
geboren am 24.05.1976 in Hannover
Familienstand: verheiratet

Hochschulausbildung:

09/2002 - 01/2007	Promotion am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Gesamtnote: „Sehr gut“
08/2002	Universitätsabschluss als Diplom-Chemiker, Note „Sehr gut“
01/2002 - 08/2002	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover
1995 - 2002	Chemiestudium am Fachbereich Chemie der Universität Hannover

Schulische Ausbildung:

06/1995	Abitur, Note „Sehr gut“
1988 - 1995	Georg-Büchner-Gymnasium Seelze
1986 - 1988	Orientierungsstufe Seelze
1982 - 1986	Grundschule Seelze